Aus dem Institut für Pharmakologie der
Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr med. K. Greeff

# UNTERSUCHUNGEN ZUR GEWINNUNG ISOLIERTER, ADULTER MUSKELZELLEN AUS MEERSCHWEINCHEN-HERZEN UND DEREN EXPERIMENTELLE EIGNUNG

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
**Peter Wacker**
1984

Yale
Library
Bibl.

Aus dem Institut für Pharmakologie der
Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. K. Greeff

# Untersuchungen zur Gewinnung isolierter, adulter Muskelzellen aus Meerschweinchenherzen und deren experimentelle Eignung

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Peter Wacker

1984

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez.: Prof. Dr. Hopf

Referent
gez.: Prof. Dr. Noack
Korreferent
gez.: Prof. Dr. Borchard

Meinem zwischenzeitlich verstorbenem Vater gewidmet

Inhaltsverzeichnis


| | | | |
|---|---|---|---|
| I. | Einleitung | S. 1 | |
| II. | Reagenzien | S. 3 | |
| III. | Methode | S. 4 | - 14 |
| | 1. Versuchsaufbau | S. 4 | |
| | 2. Perfusionslösungen | S. 9 | |
| | 3. Präparationsmethode | S. 11 | |
| IV. | Funktionsprüfungen | S. 15 | - 23 |
| | 1. Lichtmikroskopisch | S. 15 | |
| | 2. Elektronenmikroskopisch | S. 18 | |
| V. | Untersuchungen an isolierten Herzzellen | S. 24 | - 33 |
| | 1. Proteinbestimmung | S. 24 | |
| | 2. Zellzahlbestimmung | S. 25 | |
| | 3. Ergebnisse | S. 3o | |
| | 4. Faktoren zur Gewinnung brauchbarer Zellsuspensionen | S. 33 | |
| VI. | Eigenschaften der Zellsuspension | S. 34 | - 65 |
| | 1. Haltbarkeit | S. 34 | |
| | 2. Intrazellulärraum | S. 42 | |
| | 3. $Ca^{++}$-Austausch | S. 53 | |
| VII. | Zusammenfassung und Diskussion | S. 66 | - 68 |

VIII. Anhang S. 69 - 92

IX. Literaturverzeichnis S. 93 - 96

X. Danksagungen S. 97

XI. Lebenslauf S. 98

**Einleitung**

Seit vielen Jahren wird der Wirkungsmechanismus herzwirksamer Pharmaka an isolierten Organen, insbesondere am Langendorff-Herzen, erforscht. Später ging man dazu über, auch mit einzelnen Organteilen, wie z.B. den Herzvorhöfen zu arbeiten und daran pharmakologische Studien zu betreiben.

Ein grundsätzlicher Nachteil dieser Arbeitsmethode besteht aber darin, daß man eine große Anzahl von Versuchstieren benötigt, um eindeutige Ergebnisse zu erhalten. Außerdem sind solche Studien sehr zeitaufwendig, da man gleichzeitig immer nur mit einer kleinen Anzahl von Organen bzw. Organteilen arbeiten kann.

Ein Vorteil wäre es daher, einzelne, intakte Herzzellen einsetzen zu können. Mit einem solchen sozusagen "pipettierbar" gemachtem Herzen könnte eine große Anzahl von Versuchen gleichzeitig durchgeführt werden.

Nachdem verschiedene Arbeitsgruppen über die erfolgreiche enzymatische Zerlegung von Herzen berichtet haben (1; 3; 4; 5; 7; 1o; 12; 22; 23;), war es Ziel der vorliegenden Arbeit, ein brauchbares Verfahren zur enzymatischen Zerlegung des Meerschweinchenherzens aufzubauen und die grundsätzliche Brauchbarkeit eines derartigen Ver-

suchsmodells für biochemische und pharmakologische Fragestellung zu überprüfen.

Das hier angewendete Prinzip der Gewinnung adulter isolierter Herzzellen besteht darin, daß das frisch entnommene Herz adulter Meerschweinchen mit einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung unter Zusatz der proteolytischen Enzyme Collagenase und Hyaloronidase perfundiert wird. Die Perfusionszeit ist dabei so zu bemessen, daß die Enzyme die Kittsubstanz zwischen den einzelnen Zellen des Herzgewebes auflösen können, ohne aber auch noch die Zellmembran anzugreifen und damit die Zelle zu schädigen. Nach rechtzeitiger Unterbrechung der Enzymperfusion sollte das Herz weitgehend in einzelne intakte Zellen disaggregiert sein.

Nach verschiedenen Autoren (15; 17; 18; 21; 24) sollten Calciumionen bei der Präparation nicht zugegen sein, da dadurch die Zellen sehr schnell zerstört werden. Das bei der Proteolyse freiwerdende Calcium wird deshalb durch EGTA abgefangen.

Der Zusatz von Dimethylsulfoxid (DMSO) verhütet einerseits weitgehend die proteolytische Zerstörung der Zellen während der Präparation (1o) und dient andererseits als Kryoprotektikum während der Aufbewahrung bei 4°C (11; 16; 19).

**Verwendete Reagenzien**

| | |
|---|---|
| Antimycin A reinst | Serra, Heidelberg<br>Art. 1369o |
| Atractylosid | Calbiochem, Los Angeles<br>Art. 189222 |
| $^{14}C$-Carboxyinulin (2,o4 mCi/g) | New England Nuclear<br>Lot.-Number 1o86-o66 |
| $^{45}CaCl_2$ (1o mCi/ml) | New England Nuclear<br>NEZ o13, S 14o1 |
| Collagenase (C-5138)<br>Typ IV | Sigma Chemical Company<br>Lot.-Number 88 C- 689o |
| Dimethylsufoxid (DMSO) | Merck, Art.-Nr. 2931 |
| $^{3}H_2O$ (1 mCi/g) | New England Nuclear<br>Lot.-Number 9o9-137 |
| Lanthanchlorid ($LaCl_3$ $7H_2O$) | Fluka AG, Nr. 6149o |
| g-Strophanthin (Ouabain) | Merck, Art.-Nr. 7896 |

## Versuchsaufbau

Drei Erlenmeyerkolben wurden durch Schläuche und zwei Dreiwegehähne derart mit einer Rollenpumpe verbunden, daß jede Lösung einzeln angesaugt und durch das Herz gepumpt werden konnte. Ein Dreiwegehahn trennte die Enzymlösung von den beiden anderen Perfusionslösungen, der andere Dreiwegehahn trennte die beiden Perfusionslösungen voneinander. Alle Lösungen wurden von Carbogen durchperlt. Zwischen dem Dreiwegehahn, der die Enzymlösung von den beiden anderen Lösungen trennte, und der Pumpe, wurde der Geber für das Flowmeter angeschlossen. Um die Lösung auf eine Temperatur von 37° Celsius zu bringen, wurde sie durch eine Heizspirale geleitet, die von 39° Celsius bis 41° Celsius warmen Wasser umspült wurde. Hinter dieser Heizspirale wurde die Kanüle angeschlossen, die in das Herz eingebunden wurde. Der Geber für das elektrische Manometer lag in der Zuleitung zwischen Pumpe und Heizspirale.
Ein elektrisches Digitalthermometer, dessen Temperaturfühler dem Herzen anlag, ermöglichte eine kontinuierliche Temperaturmessung während der Perfusion. Dies war erforderlich, da die Temperatur des Herzgewebes durch die unterschiedliche Durchströmung mit Nährlösung (s. Versuchsdurchführung) nicht konstant blieb. Bei jeder Flowänderung mußte deshalb der Thermostat der Heizspirale, die das Perfusat unmittelbar vor dem Einlauf in die Aortenwurzel erwärmte, nach-

reguliert werden. Ein Trichter unter dem Herzen fing die herabfallenden Tropfen auf und leitete sie in den Abfluß. Ein zweiter Trichter, der die Enzymlösung in das Ausgangsgefäß zurückleitete und so eine rezirkulierende Perfusion mit der Enzymlösung ermöglichte, konnte bei Bedarf unter das Herz gedreht werden (Abb. 2).

Der bestehende Versuchsaufbau ermöglichte also die Perfusion des Herzens unter vorgegebenem Flow bei konstanter Temperatur.

Registriert wurden dabei (Abb. 1):

1. Der zeitliche Ablauf der Perfusion.
2. Die Durchflußgeschwindigkeit der einzelnen Lösungen.
3. Der Druckabfall, der als Parameter für die Gewebedisaggregation herangezogen wurde.

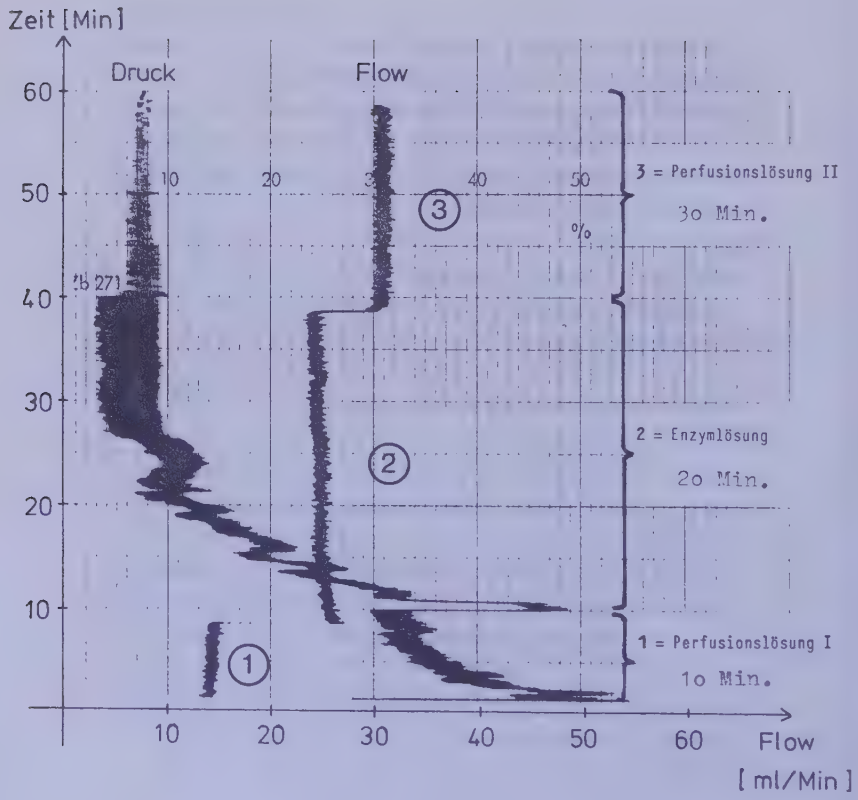



**Abb. 1** Dokumentation der Flow- und Druckverhältnisse während der Präparation (2-Kanal-Schreiber)

**1** = Perfusionslösung I

**2** = Enzymlösung (Druckkurve nicht geeicht!)

**3** = Perfusionslösung II

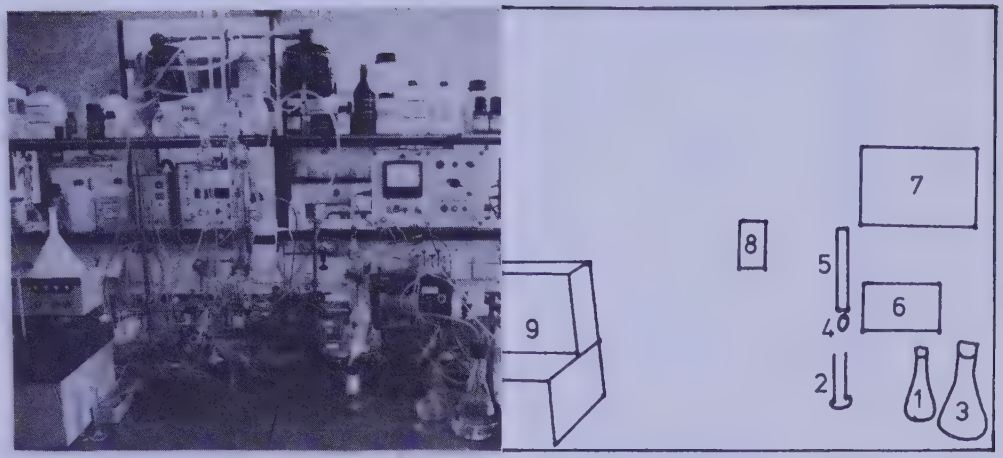



Foto 1

Präparationsanlage

1= Lösung I; 2= Enzymlösung; 3= Lösung II; 4= freipräpariertes Herz; 5= Heizspirale; 6= Pumpe; 7= Manometer; 8= Digitalthermometer; 9= Wasserbad (für die Heizspirale)

Flowmeter und 2-Kanal-Schreiber nicht im Bild

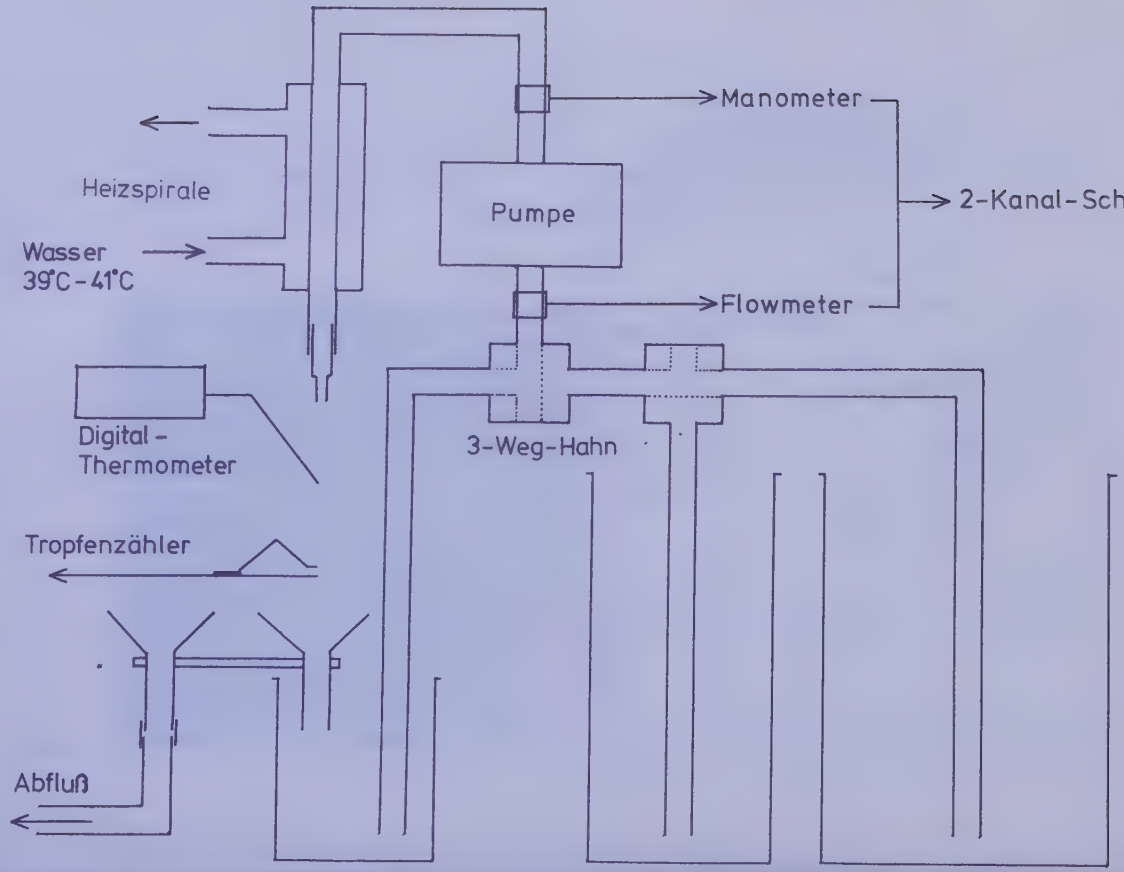



Abb. 2 Schematischer Versuchsaufbau

**Zusammensetzung der Perfusionslösungen**

Zur Herstellung der Perfusionslösungen dienten zwei Stammlösungen, die im Kühlraum (2° Celsius) aufbewahrt wurden.

**Stamm 1:**

277,oo g NaCl
14,15 g KCl
11,75 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$
Aqua dest. ad 2ooo,o ml

**Stamm 2:**

6,49 g $KH_2PO_4$
Aqua dest. ad 5oo,o ml

Hiermit wurden die Perfusionslösungen für jede Präparation neu hergestellt.

**a)** Perfusionslösung I
(118 mM NaCl; 4,8 mM KCl; 1,4 mM $MgSO_4$; 1,2 mM Phosphat; 25 mM $NaHCO_3$; 11 mM Glucose; pH 7,4; 294 mOsmol)

25,oo ml Stamm 1
6,25 ml Stamm 2
1,oo g Glucose
1,o5 g $NaHCO_3$
Aqua dest. ad 5oo,o ml

b) Perfusionslösung II
(118 mM NaCl; 4,8 mM KCl;1,2 mM $MgSO_4$; 1,2 mM Phosphat; 25 mM $NaHCO_3$; o,5 mM EGTA; 3o mM Taurin; 1o% (v/v) DMSO; pH 7,4; 3o5 mOsmol, gemessen ohne DMSO).

| | |
|---|---|
| 5o,oo | ml Stamm 1 |
| 12,5o | ml Stamm 2 |
| 2,1o | g $NaHCO_3$ |
| o,15 | g EGTA |
| 3,75 | g Taurin |
| 1oo,oo | ml DMSO |

Aqua dest. ad 1ooo,o ml

c) Enzymlösung
(o,o5 % Collagenase, o,2 % Hyaloronidase)

| | |
|---|---|
| o,o25 | g Collagenase |
| o,1 | g Hyaloronidase |

Perfusionslösung I ad 5o,o ml

**Präparationsmethode**

Nach kompletter Reinigung der Perfusionsanlage wurden die Erlenmeyerkolben mit den entsprechenden, frisch zubereiteten Perfusionslösungen gefüllt und dafür gesorgt, daß jede Lösung gleichmäßig mit Carbogen durchperlt wurde. Die gesamte Anlage wurde luftblasenfrei mit Perfusionslösung I gefüllt und 1 bis 2 Minuten mit dieser Lösung durchspült. So konnte man sicher sein, daß sich keine Reste von Reinigungsflüssigkeit mehr in der Anlage befanden.

Nach dieser Vorbereitung wurden einem Meerschweinchen (ca. 5oo g) intraperitoneal 1,o ml Liquemin$^{R}$ injiziert, um die Blutgerinnung herabzusetzen und somit zu verhindern, daß Blutkoagel die Herzgefäße verstopfen. Nach 3o Minuten wurde das Tier durch Genickschlag getötet und über die Karotiden entblutet. Sofort danach wurde der Thorax eröffnet und eine Ligatur um die Aorta gelegt, distal der Ligatur die Aorta eröffnet und eine Kanüle eingeführt. Sofort nach Einbinden der Kanüle begann die Perfusion mit Lösung I (37° Celsius, 2 ml/Min.). Nach Einschneiden des rechten Atriums wurde die Perfusion auf 5 - 6 ml/Min. gesteigert. Dann wurde das Herz entnommen, der Verlängerunsschlauch der Kanüle entfernt, das Herz in die Anlage gehängt, umgebendes Gewebe sorgfältig entfernt und der Flow für 1o Minuten auf 15 ml/Min. gesteigert. Im Anschluß daran wurde das Herz 3o Minuten mit der

Enzymlösung rezirkulierend perfundiert, wobei darauf geachtet wurde, daß durch einen entsprechenden Vorlauf vor Umstellung auf Rückflußperfusion die Enzymlösung nicht durch noch eventuell in der Anlage vorhandene Lösung I verdünnt wurde. Nach dieser Rückflußperfusion wurde das Herz noch 2o Minuten mit der Lösung II perfundiert und der Flow auf 3o ml/Min. gesteigert.

**Foto 2**

Freipräpariertes Herz mit eingebundener Perfusionskanüle
und angelegtem Temperaturfühler.
Unter dem Herzen ein Trichter zum Ableiten der Perfusions-
flüssigkeit.

Nach einer Gesamtperfusionszeit von 6o Minuten wurde das Herz in 1o ml eisgekühlte Perfusionslösung II gelegt und zur weiteren Präparation in den Kühlraum (2° Celsius) gebracht. Dort wurde das Pericard vorsichtig mit einer Schere eröffnet und der Zellbrei möglichst vollständig in 2o ml eisgekühlte Lösung II ausgestrichen. Diese Suspension wurde durch ein Nylon-Netz (2oo µm Maschenweite) in ein 5o ml Plastik-Zentrifugenröhrchen gefiltert. Das Nylon-Netz, das in einem speziellen Trichter fest eingespannt war, wurde dann noch zweimal mit je 1o ml Perfusionslösung II (eisgekühlt) ausgewaschen. Die so erhaltene Suspension wurde 2 Minuten mit 5o g zentrifugiert, der Überstand aufgehoben und das Zentrifugat erneut in 4o ml kalter Perfusionslösung II suspendiert. Nach nochmaliger Zentrifugation wurde das Zentrifugat in 3o ml Perfusionslösung suspendiert und im Kühlraum bei 2° Celsius unter ständiger Durchmischung mit einem Magnetrührer aufbewahrt.

**Funktionsprüfungen**

**1. Lichtmikroskopisch**

Die lichtmikroskopische Untersuchung der im methodischen Teil beschriebenen Zellsuspension zeigte eine große Anzahl einzelner, länglicher, nicht zusammenhängender Zellen (Foto 3).

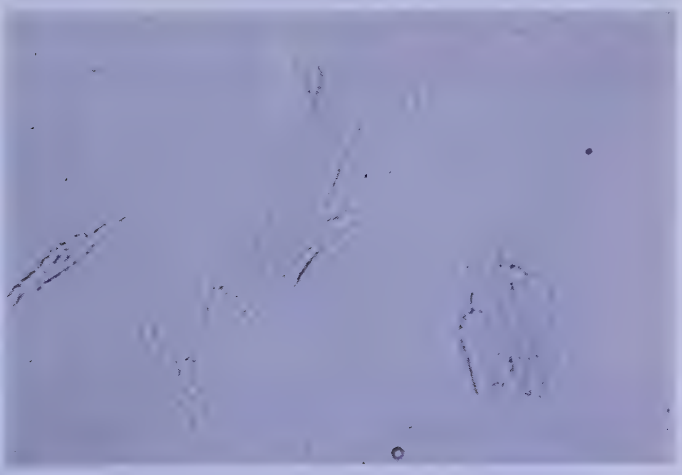


**Foto 3**

Zwei ungefärbte Herzzellen, Vergr. 128 x
links im Bild 2 Zelltrümmer

Sie besaßen eine deutliche Querstreifung, der ovale Zellkern saß zentral in der Zellmitte. Die Mehrzahl der Zellen zeigte scharfe Umrisse und nicht abgerundete Ecken, was als Indiz für intakte Zellen anzusehen ist. Daneben konnte man aber auch kugelförmige, nicht scharf begrenzte Zellen sehen. Nach Färbung mit Trypan-Blau (Foto 4) färbten sich diese kugeligen Zellen insgesamt intensiv blau an, während sich bei den übrigen, scharf begrenzten Zellen höchstens der Zellkern leicht färbte, die Zelle sonst aber ungefärbt blieb. Neben der charakteristischen Abrundung konnte man so durch Färbung mit Trypan-Blau deutlich die zerstörten Zellen von den intakten Zellen unterscheiden und getrennt auszählen (Foto 5).

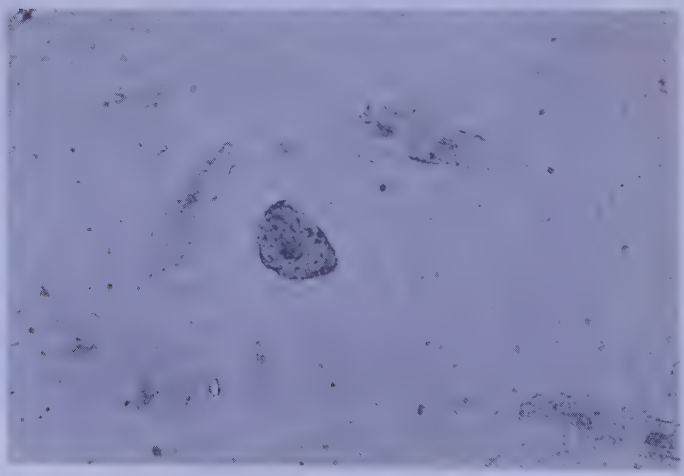


Foto 4

Mit Trypan-Blau gefärbte Herzzellen, Vergr. 128 x,
in der Mitte des Bildes liegt eine typisch abgerundete, stark angefärbte, zerstörte Herzzelle

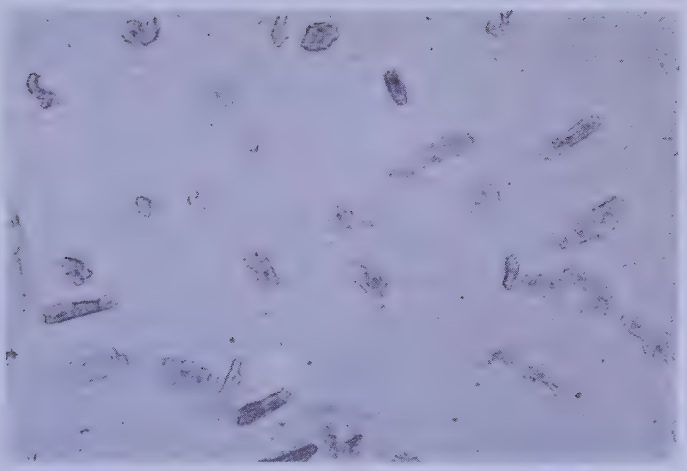


Foto 5

Gefärbte Zellen im Zählgitter der Neubauer-Zählkammer,
Vergr. 5o x

Nach Zusatz einer 1 %igen Triton-Lösung zur Zellsuspension konnten mikroskopisch keine Zellen mehr nachgewiesen werden, da das Detergens Triton die Zellmembranen auflöste.

Auch nach Behandlung der Zellsuspension mit Ultraschall konnten keine kompletten Zellen mehr beobachtet werden. Es zeigten sich lediglich Zellbruchstücke, die sich teilweise zu größeren Verbänden zusammengelagert hatten.

## 2. Elektronenmikroskopisch

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten bei schwacher Vergrößerung Herzmuskelzellen in geringem Kontraktionszustand. Der Zellkern war intakt und enthielt neben einem zentral gelegenen Nukleolus aufgelockertes Heterochromatin, das z.T. marginal an die Kernmembran verdichtet war. Die Kernmembran war intakt. Einmal wurde eine geringe Einwässerung dieser doppelten Lamelle beobachtet. Die Myofilamente zeigten einen regelrechten Abstand der Z-Streifen, wobei die I-Bänder infolge einer mäßiggradigen Kontraktion zumeist schmal erschienen. Die zwischen den Muskelzellen in regelrechter Anzahl vorkommenden Mitochondrien zeigten eine zumeist gut erhaltene Crista-Struktur. Hydropisch geschwollene Mitochondrien traten sehr selten auf. Auch Calciumgranula der Mitrochondrienmatrix, die bei Hypoxie auftreten, fehlten in den Zellen weitgehend. Auffällig war eine Dilatation des transversalen Systems, gelegentlich auch der longitudinalen Tubuli.

Das Grundplasma ließ Glykogengranula sowie Polyribosomen in normaler Konzentration erkennen. Offenbar war es infolge einer leichten Volumenzunahme zu einer geringen Vorbuckelung des Plasmalemmas an der Außenseite der Zelle gekommen, die jedoch nur in einzelnen Zellen sichtbar war. Die Basalmembran fehlte streckenweise.

Zusammenfassend war der Zustand der Herzzellen sehr gut.

(Befundung durch Prof. Dr. Borchert, Pathologisches Institut der Universität Düsseldorf, Mohrenstraße 5).

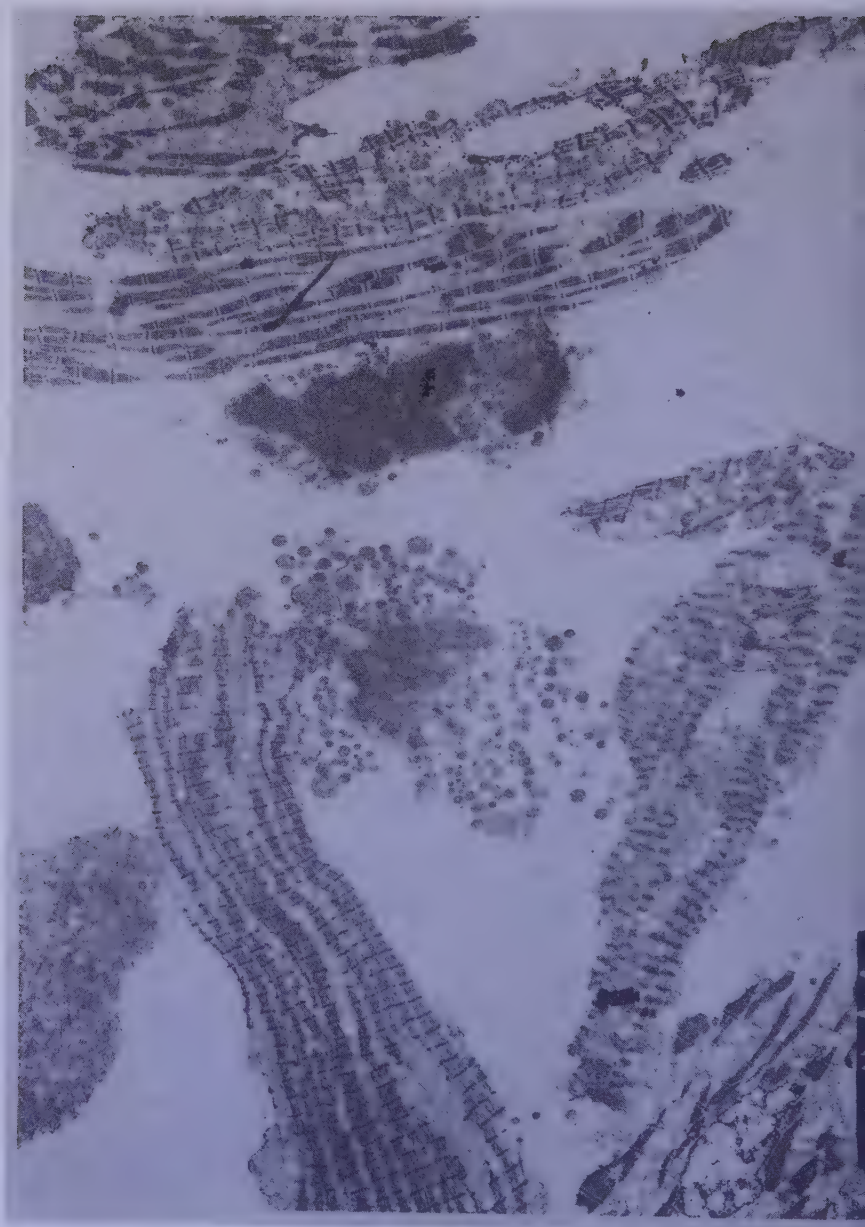


Foto 6

Suspension isolierter Herzzellen, elektronenoptisch, Vergr. 2ooo x

Foto 7

Suspension isolierter Herzzellen, elektronenoptisch, Vergr. 5800 x
Surkomerenlänge ca. 2 µm

Foto 8

Isolierte Herzzelle, elektronenoptisch, Vergr. 16000 x

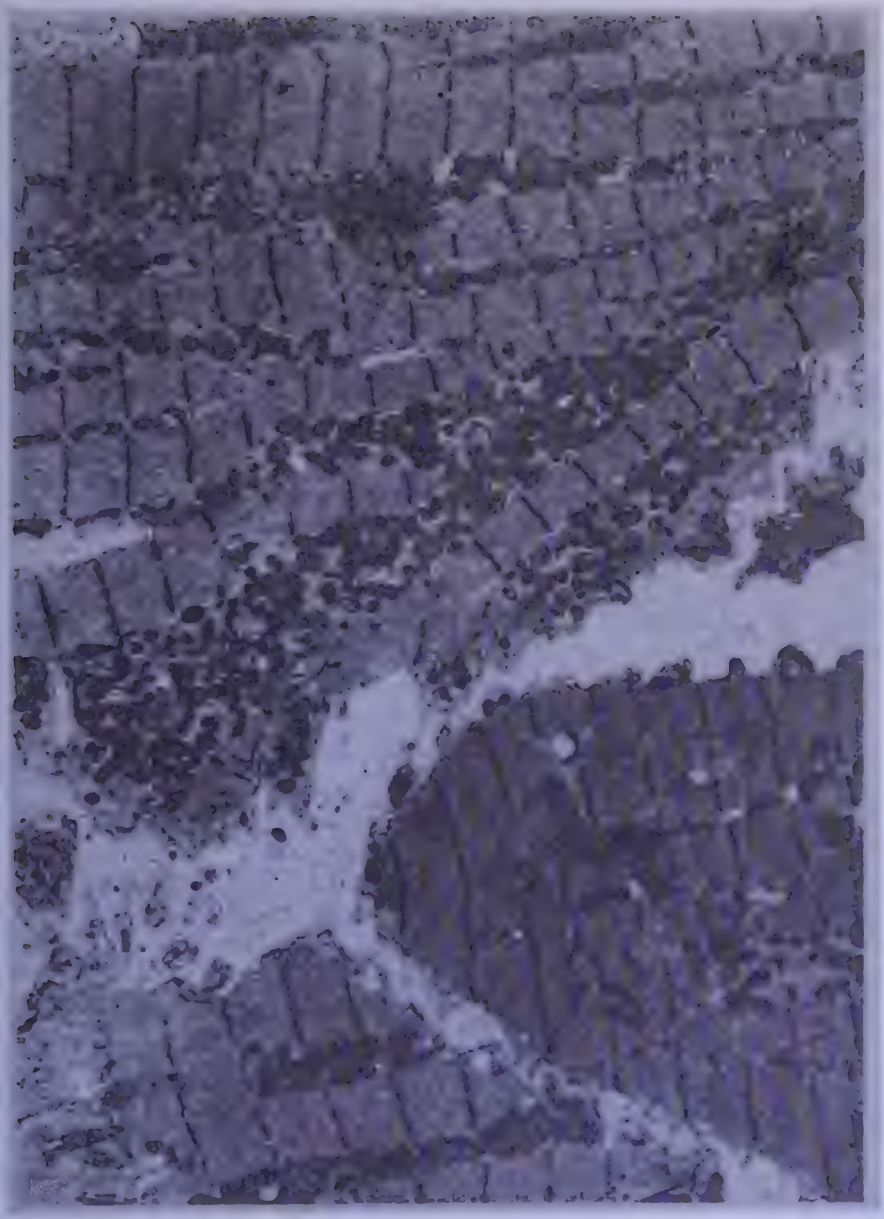


Foto 9

Herzzellen im Gewebeverband, Vergleichsbild

## Untersuchungen an isolierten Herzzellen

### 1. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Zellsuspension wurde nach der Biuret-Methode bestimmt. Als Standard diente eine Rinderalbuminlösung mit einer Konzentration von 4 mg/ml Lösung II. Um alle Proteine zu erfassen, mußten die Zellmembranen aufgelöst werden. Das erreichte man durch Zusatz des Detergens Triton.

**Ansätze:**

| | | |
|---|---|---|
| 1. | Tritonlösung 1 % | 1,o ml |
| | Biuret-Reagenz | 1,o ml |
| | Lösung II | o,2 ml |
| 2. | Tritonlösung 1 % | 1,o ml |
| | Biuret-Reagenz | 1,o ml |
| | Zellsuspension | o,2 ml |
| 3. | Tritonlösung 1 % | 1,o ml |
| | Biuret-Reagenz | 1,o ml |
| | Standardlösung | o,2 ml |

Die Ansätze wurden 3o Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, die Extinktion dann bei 546 nm gemessen und der Eiweißgehalt der Zellsuspension mit folgender Formel berechnet:

$$\text{mg Protein/ml Zellsuspension} = \frac{E_{\text{Zellsuspension}} - E_{\text{Lösung II}}}{E_{\text{Standard}} - E_{\text{Lösung II}}} \times \text{mg Protein/ml Standard}$$

## 2. Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl in der Suspension eignete sich die Neubauer-Zählkammer (Abb. 3).

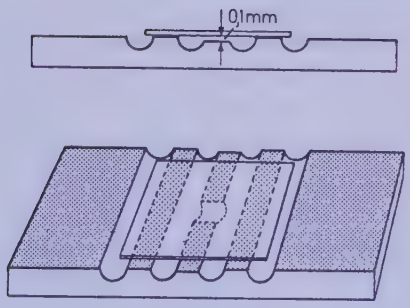



**Abb. 3** Neubauer-Zählkammer

Der optisch plane Boden der Zellkammer ist mit einem rechtwinkeligen Zählnetz versehen, das aus Linien in definierten Abständen besteht (Abb. 4).

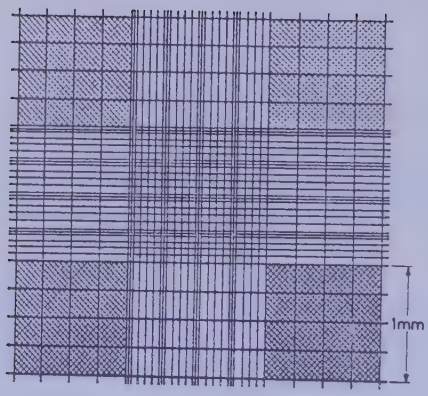



**Abb. 4** Zählnetz der Zählkammer

Durch Aufbringen eines optisch plan geschliffenen Deckglases wird über der Bodenfläche ein Raum begrenzt, in dem die Zellen mikroskopisch ausgezählt wurden. Um zu gewährleisten, daß sich das Deckglas in reproduzierbarem Abstand vom Boden der Kammer befand, wurden die plan geschliffenen Glasflächen der Kammern leicht angefeuchtet (durch Anhauchen) und das geschliffene Deckglas so von der Seite her aufgeschoben, daß auf beiden Flächen Newton'sche Ringe sichtbar wurden. Die beiden Kammern (oberhalb und unterhalb der Überlaufrinne) wurden mit einer 2o µl Pipette so mit Ansatzsuspension gefüllt, daß die Pipettenspitze dicht am Rande des Deckglases schräg auf den Boden der Zellkammer aufgesetzt und die Ansatzsuspension vorsichtig in die Zellkammer gegeben wurde, bis

diese bis zur Überlaufrinne luftblasenfrei gefüllt war.

**Ansatzsuspension:**

500 µl Zellsuspension
+ 100 µl Trypanblau-Lösung (0,4 % in Lösung II)

Die Zellen in den vier Eckquadraten wurden dann unter dem Mikroskop mäanderförmig ausgezählt. Von den auf den Linien des Zählnetzes liegenden Zellen wurden nur diejenigen gezählt, die sich auf dem linken und oberen Rand des jeweiligen Quadrates befanden.

**Berechnung:**

| | | | |
|---|---|---|---|
| Fläche | 1 Eckquadrat | = | 1,0 mm² |
| Höhe | 1 Eckquadrat | = | 0,1 mm |
| Volumen | 1 Eckquadrat | = | 0,1 µl |
| Volumen | 4 Eckquadrate | = | 0,4 µl |

Summe der Zellen in allen 4 Eckquadraten= n

n = Zellen in 0,4 µl Ansatzsuspension

$n \times \frac{1,0}{0,4}$ = Zellen in 1,0 µl Ansatzsuspension

$n \times \frac{1000 \times 6}{0,4 \times 5}$ = Zellen in 1,0 ml Zellsuspension

daraus folgt:

n x 3000 = Zellen in 1,0 ml Zellsuspension

Da der Objektträger 2 Zellkammern besaß, war es möglich, jeweils Doppelbestimmungen durchzuführen.

Die Daten und Ergebnisse der Basisuntersuchungen (Protein- und Zellzahlbestimmung) wurden in einem Präparationsprotokoll festgehalten (Abb.5).

Zur Arbeitserleichterung wurden Rechenprogramme für den Rechner HP 25 von Newlett-Packard erstellt (s. Anhang, Rechenprogramme).

Abb. 5 Beispiel eines Präparationsprotokolls

**Präparationsprotokoll vom** 25.11.8o

Tiergewicht: 385 g
Präparationsende: 11.3o Uhr
Menge der hergestellten Suspension: 3o,o ml
Bemerkungen: normale Präparation
keine Besonderheiten

Zellzahlbestimmung

Zählung 1: 179 davon erkennbar zerstört: 19
Zählung 2: 2o4 davon erkennbar zerstört: 21
Mittelwert: 191,5 2o

| | | |
|---|---|---|
| Zellzahl | : 574ooo | Zellen/ml Susp. |
| Zahl der zerstörten Zellen | : 6oooo | Zellen/ml Susp. |
| Zahl der intakten Zellen | : 514ooo | Zellen/ml Susp. |
| Prozentsatz an intakten Zellen | : 89,56 | % |

Proteinbestimmung

Konzentration des Standards: 4,o mg/ml

$E_{Lösung\ II}$ : 96
$E_{Standard}$ : 184
$E_{Zellsusp.}$ a : 149
b : 151 Mittelwert: 15o
c : 15o

Proteingehalt der Zellsuspension: 2,45 mg/ml
Gesamtausbeute: 73,64 mg Protein

Proteingehalt einer Zelle: $4,27 \times 1o^{-6}$ mg
1,o mg Protein = 234o56 Zellen

Mit der Zellsuspension durchgeführte Untersuchungen:

1. ICR-Bestimmung
2. $Ca^{++}$-Austausch

## 3. Ergebnisse der einzelnen Präparationen

| Präparation | Zellzahl/ml Susp. | % intakter Zellen | mg Protein/ml Susp. | mg Protein/Zelle |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 449ooo | 81,51 | 4,o3 | $5,98 \times 1o^{-6}$ |
| 2 | 799ooo | 95,24 | 4,44 | $3,71 \times 1o^{-6}$ |
| 3 | 697ooo | 93,4o | 4,64 | $4,44 \times 1o^{-6}$ |
| 4 | 4785oo | 89,o3 | 2,33 | $4,87 \times 1o^{-6}$ |
| 5 | 432ooo | 86,81 | 1,99 | $4,61 \times 1o^{-6}$ |
| 6 | 5865oo | 95,4o | 3,21 | $5,47 \times 1o^{-6}$ |
| 7 | 663ooo | 9o,o5 | 3,32 | $5,oo \times 1o^{-6}$ |
| 8 | 231ooo | 95,24 | 1,82 | $5,25 \times 1o^{-6}$ |
| 9 | 477ooo | 91,51 | 2,41 | $5,o5 \times 1o^{-6}$ |
| 1o | 425ooo | 94,82 | 3,37 | $5,29 \times 1o^{-6}$ |
| 11 | 4o35oo | 9o,33 | 2,27 | $5,63 \times 1o^{-6}$ |
| 12 | 6675oo | 85,39 | 2,38 | $3,56 \times 1o^{-6}$ |
| 13 | 37o5oo | 89,o7 | 3,o9 | $8,33 \times 1o^{-6}$ |
| 14 | 5745oo | 89,56 | 2,45 | $4,27 \times 1o^{-6}$ |
| 15 | 5415oo | 91,97 | 2,67 | $4,93 \times 1o^{-6}$ |
| 16 | 438ooo | 92,81 | 2,96 | $6,75 \times 1o^{-6}$ |
| 17 | 57oooo | 94,47 | 3,17 | $5,56 \times 1o^{-6}$ |
| 18 | 559ooo | 89,81 | 2,47 | $4,42 \times 1o^{-6}$ |
| Mittelwert | $\bar{x}$ =52o139<br>$s_{\bar{x}}$=132245<br>n = 18 | $\bar{x}$ =9o,91<br>$s_{\bar{x}}$= 3,68<br>n =18 | $\bar{x}$ =2,95<br>$s_{\bar{x}}$=o,78<br>n =18 | $\bar{x} = 5,17 \times 1o^{-6}$<br>$s_{\bar{x}}$=1,o7<br>n =18 |
| Variations-koeffizient | 25,42 % | 4,o5 % | 26,44 % | 2o,7o % |

**Tab. 1** Auflistung der Präparationsergebnisse

Bei der Auswertung der Präparationsergebnisse zeigte sich ein relativ konstanter Prozentsatz an intakten Zellen mit einem Mittelwert von 9o,91 % und einem Variationskoeffizienten von 4,o5 % ($s_{\bar{x}}$ = 3,68; n = 18).

Hohe individuelle Schwankungen ergaben sich bei der Bestimmung der Zellzahl/ml Suspension und des Proteingehalts/ml Suspension. Dies ist verständlich, da beide Faktoren von der Größe und Beschaffenheit des zu zerlegenden Herzens abhängig sind.

Unbefriedigend war der Variationskoeffizient von 2o,7 % bei der Bestimmung des Proteingehaltes einer Zelle, da hier wegen der immer annähernd gleichen Zellgröße relativ konstante Werte zu erwarten sind. Diese Abweichung könnte durch eine unterschiedliche Präparationsgüte bedingt sein.

Nimmt man als Güteparameter den erreichten Prozentsatz an intakten Zellen und beschränkt sich auf die Auswertung jener Präparationen, die einen hohen Anteil an intakten Zellen aufweisen, so ergibt sich als Mittelwert für den Proteingehalt einer Zelle:

$$5{,}14 \times 10^{-6}\ \text{mg Protein/Zelle}$$

($s_{\bar{x}} = o{,}38 \times 10^{-6}$; V = 7,37 %.

Als Gütekriterium einer Präparation kann daher neben dem erreichten Prozentsatz an intakten Zellen auch die Bestimmung des Proteingehaltes einer Zelle herangezogen werden.

## 4. Faktoren, die sich für die Gewinnung brauchbarer Zellsuspensionen als essentiell herausgestellt haben

a) Die angegebenen Präparationsbedingungen gelten für ein Tiergewicht von 4oo g (± 5o g). Es zeigte sich, daß man bei kleineren Tieren (= kleineres Herz) in der Suspension keine gute Ausbeute an intakten Zellen erhält (<8o%).

b) Die Perfusionsbedingungen müssen genau eingehalten werden (Temperatur, Flow). Wurde länger oder kürzer perfundiert, wurden die Präparationen, d.h. die Ausbeute an intakten Zellen, schlechter.

c) Innerhalb einer Versuchsreihe sollte stets die gleiche Charge der zur Disaggregation der Zellen verwendeten proteolytischen Enzyme verwendet werden, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

d) Bei der Zellzählung ist auf ein exaktes Auflegen des Deckglases und auf luftblasenfreie Füllung der Kammern zu achten.

## Eigenschaften der Zellsuspensionen

### 1. Untersuchungen zur Haltbarkeit der Zellsuspensionen

Eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung pharmakologischer Untersuchungen war eine ausreichende Haltbarkeit der Zellsuspension, da für die quantitative Erfassung, z.B. des zellulären Calcium-Austausches die genaue Kenntnis des Anteils an intakten Herzzellen Voraussetzung ist.

Zur Überprüfung der Haltbarkeit wurden in zwei Plastik-Reagenzgläsern (1o ml) je 5,o ml Zellsuspension gegeben und entweder bei 2°C (Kühlraum) oder 25°C (Wasserbad) unter ständiger Durchmischung mit einem Magnetrüher inkubiert. Aus den Ansätzen wurden zu verschiedenen Zeiten (5 - 255 Minuten) aliquote Mengen (5oo µl) entnommen mit 1oo ml Trypanblau-Lösung versehen, gut durchgeschüttelt und unter dem Mikroskop auf Intaktheit untersucht.

| Temperatur | Min. nach Ansatzbeginn | % der intakten Zellen | Regressionsgerade |
|---|---|---|---|
| | 2o | 91,36 | |
| | 75 | 91,97 | y = o,o1x + 91,24 |
| 2°C | 13o | 91,66 | |
| | 2o5 | 92,27 | |
| | 255 | 92,77 | r = o,91 n = 5 |
| | 15 | 91,oo | |
| 25°C | 45 | 87,o7 | y = o,o9x + 91,72 |
| | 95 | 82,31 | |
| | 15o | 78,42 | r = o,99 n = 4 |

**Tab. 2** Haltbarkeit der Suspension isolierter Herzzellen bei unterschiedlichen Temperaturen

Die Meßergebnisse und die Berechnung der Regressionsgeraden zeigen, daß die im Kühlraum bei 2°C inkubierte Zellsuspension während des Untersuchungszeitraumes (255 Min.) keine Veränderungen erfährt. Im Gegensatz dazu ging der Anteil an intakten Zellen in der bei 25°C inkubierten Suspension während des Untersuchungszeitraumes (15o Minuten) kontinuierlich zurück.

Die Richtigkeit der Beobachtung wurde auch dadurch unterstrichen, daß sich der y-Koordinatenabschnitt beider Regressionsgeraden, d.h. der prozentuale Anteil an intakten Zellen bei Ansatzbeginn (x = o), mit der direkt nach der Präparation durchgeführten Zellzählung (91,o9 %) praktisch identisch war.

Zu weiteren Untersuchungen wurden von einer bei 2°C unter den gleichen Bedingungen inkubierten

Zellsuspensionen im Abstand von 1 Stunde Proben entnommen und bei 25°C inkubiert. Stets ergab sich die gleiche zeitliche Abnahme an intakten Zellen analog der direkt nach Präparationsende bei 25°C inkubierten Probe. In der bei 2°C inkubierten Suspension fanden sich allerdings am folgenden Tag (ca. 18 Stunden nach Präparationsende und Innkubationsbeginn) praktisch keine intakten Zellen mehr.

Darüber hinaus prüften wir, inwieweit die Haltbarkeit der Zellen durch die gleichzeitige Anwesenheit von Substraten (z.B. Glucose) oder von $Ca^{++}$-Ionen beeinflußt wird, da dies eine Voraussetzung für biochemische und pharmakologische Untersuchungen ist.

Dazu wurden zwei unterschiedliche Ansätze mit Glucose bzw. Glucose und $Ca^{++}$-Ionen auf ihre Haltbarkeit untersucht:

**Ansatz A:**

| | |
|---|---|
| 1,oo ml | Zellsuspension |
| 1,25 ml | Perfusionslösung II |
| o,25 ml | Glucoselösung (1oo mMol) |
| | 1o mMol/l EK! |
| 2,5o ml | EV! |

**Ansatz B:**

| | |
|---|---|
| 1,oo ml | Zellsuspension |
| 1,19 ml | Perfusionslösung II |
| o,25 ml | Glucoselösung (1oo mMol) |
| o,o6 ml | Calciumlösung (75 mMol) |
| | 1,3 mMol $Ca^{++}_{frei}$/l EK! |
| 2,5o ml | EV! |

Die Inkubation erfolgte bei folgenden Temperaturen:

a) 25°C
b) 25°C mit Carbogenbegasung
c) 37°C mit Carbogenbegasung

| Ansatz | Inkubation | Min. nach Ansatzbeginn | % der intakten Zellen | Regressionsgerade |
|---|---|---|---|---|
| Glucose (1o mMol/l) | a | 12 | 89,o8 | |
| | | 32 | 87,36 | y= -o,12x + 91,o3 |
| | | 72 | 81,86 | r= o,99 n = 5 |
| | | 96 | 8o,21 | |
| | | 14o | 73,11 | |
| | b | 16 | 91,67 | |
| | | 39 | 83,48 | y= -o,14x + 91,56 |
| | | 78 | 8o,52 | r= o,94 n = 4 |
| | | 116 | 76,65 | |
| | c | 12 | 9o,32 | |
| | | 34 | 88,61 | y= -o,23x + 94,99 |
| | | 64 | 82,17 | r= o,96 n = 4 |
| | | 89 | 72,18 | |
| Glucose + $CaCl_2$ (1,3 mMol/ $Ca^{++}_{frei}$/l) | a | 21 | 89,33 | |
| | | 62 | 82,38 | y= -o,17x + 93,87 |
| | | 85 | 8o,11 | r= o,99 n = 6 |
| | | 126 | 73,85 | |
| | | 155 | 67,19 | |
| | | 185 | 59,88 | |
| | b | 5 | 9o,49 | |
| | | 3o | 87,72 | y= -o,14x + 91,37 |
| | | 57 | 83,27 | r= 1,oo n = 4 |
| | | 1oo | 77,73 | |
| | c | 2 | 92,86 | |
| | | 25 | 88,18 | y= -o,18x + 93,53 |
| | | 54 | 87,5o | r= o,92 n = 4 |
| | | 75 | 78,26 | |

**Tab. 3** Bestimmung der Haltbarkeit einer Suspension isolierter Herzzellen in Ansätzen mit Glucose (1o mMol/l) und Glucose + $Ca^{++}$ (1,3 mMol $Ca^{++}_{frei}$/l)

**Abb. 6** Haltbarkeit der Zellsuspension in verschiedenen Ansätzen (□ = 25° C; ○ = 25° C mit Carbogenbegasung; x = 37° C mit Carbogenbegasung)

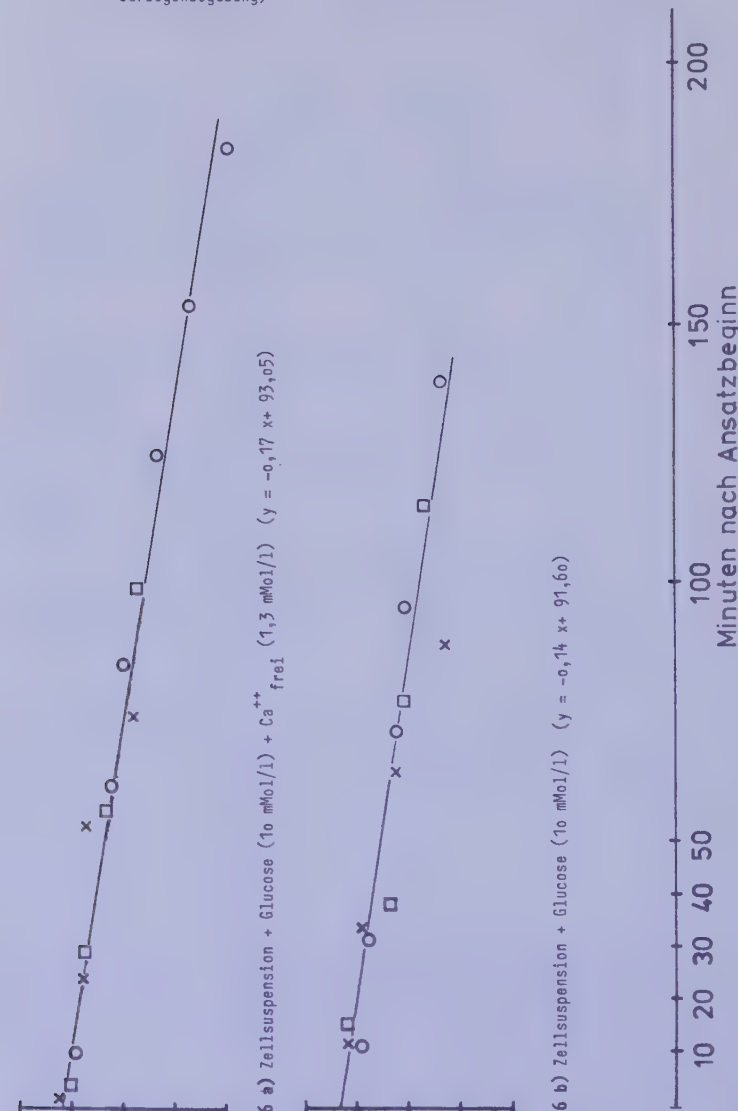



Abb. 6 a) Zellsuspension + Glucose (10 mMol/l) + $Ca^{++}_{frei}$ (1,3 mMol/l) (y = -0,17 x+ 93,05)

Abb. 6 b) Zellsuspension + Glucose (10 mMol/l) (y = -0,14 x+ 91,66)

**Abb. 6** Haltbarkeit der Zellsuspension in verschiedenen Ansätzen

- Fortsetzung-

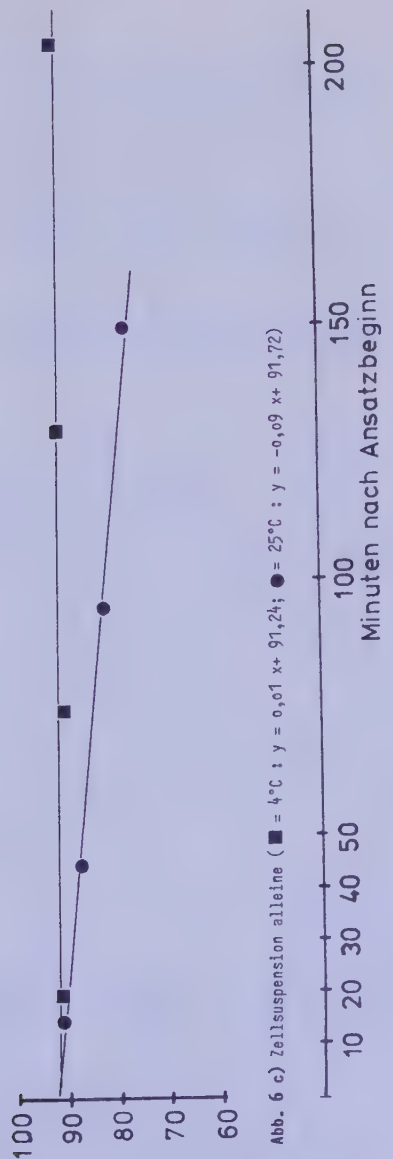



**Abb. 6 c)** Zellsuspension alleine ( ■ = 4°C : y = 0,01 x+ 91,24; ● = 25°C : y = -0,09 x+ 91,72)

Da fast identische Ergebnisse in beiden Ansätzen und bei allen Inkubationsbedingungen vorlagen, konnten die Ergebnisse zusammengefaßt werden:

Regressionsgerade für A, a-c:

$y = -o,14x + 61,6o$ ($r = o,92$, $n = 13$)

Regressionsgerade für B, a-c:

$y = -o,17x + 93,o5$ ($r = o,98$, $n = 14$)

Zusammengefaßt ergab sich die Regressionsgerade:

$y = -o,15x + 92,3o$ ($r = o,94$, $n = 31$)

(vergl. auch graphische Darstellung in Abb. 7)

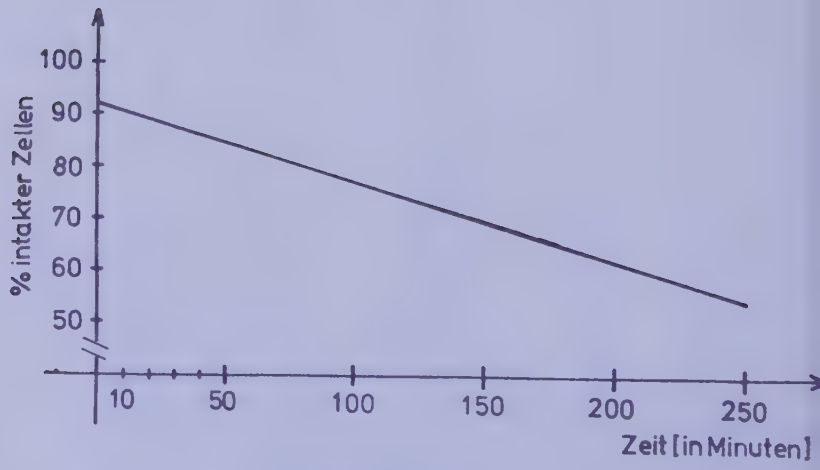



**Abb. 7** Durchschnittliche Haltbarkeit der Zellsuspension bei 25°C
($y = -o,15\ x + 92,3o$)

Die Ergebnisse erlauben folgende Schlußfolgerungen:

1. Die frisch hergestellte Suspension isolierter Herzzellen ist unter ständiger Durchmischung mit einem Magnetrührer im Kühlraum bei 2° Celsius mindestens 4 Stunden haltbar. Bei länger dauerndem Stehen (ca. 18 Stunden) geht die Zahl intakter Zellen soweit herunter, daß Messungen nicht mehr möglich sind.

2. Ansätze mit Zusatz von Glucose (1o mMol/l) und Calciumchlorid (1,3 mMol $Ca_{frei}$/l) verhalten sich unter den genannten Bedingungen bei 25° Celsius bzw. 37° Celsius wie die reine Zellsuspension ohne Zusätze, d.h., es setzt eine lineare Abnahme an intakten Zellen ein, die in einem Untersuchungszeitraum von 3 Stunden ca. 3o % beträgt.

## 2. Bestimmung des Intrazellulärraumes

Für die nachfolgenden Stoffwechseluntersuchungen an den Herzzellen war es nötig, den Intrazellulärraum (ICR) der einzelnen Herzzelle zu kennen. Zur Orientierung über die Zellgröße wurden unter dem Mikroskop einige intakte Zellen in ihrer Länge und Breite ausgemessen. Unter der vereinfachenden Vorstellung, daß die Zelle die Form eines Zylinders hat, kann das Volumen mit Hilfe der Formel $V = \pi \cdot r^2 \cdot l$ berechnet werden.

Als Mittelwerte erhielt man für die Breite 25 µm und für die Länge 55 µm. Daraus errechnete sich ein mittlerer ICR von $2,7 \times 10^{-5}$ µl ICR/Zelle.

Um individuelle Veränderungen des ICR während der Experimente erfassen zu können, führten wir die Bestimmung des ICR mit Hilfe radioaktiv markierter Substanzen durch. Wir benutzten $^{14}$C-Carboxyinulin als Markersubstanz des Extrazellulärraumes und tritiertes Wasser als Markersubstanz des Gesamtraumes (Intra- und Extrazellulärraum).

Eine aliquote Menge der Herzzellsuspension wurde mit $^{3}H_2O$ und $^{14}$C-Carboxyinulin-Lösungen versetzt. Nach Entfernung des Inkubationsmediums mittels Filtration ließ sich der $^{14}$C-Raum (entspricht dem Extrazellulärraum) und der $^{3}H_2O$-Raum (entspricht dem Gesamtraum) der Herzzellen bzw. noch anhaftender Flüssigkeit quantitativ berechnen.

Dabei ergab sich der Intrazellulärraum aus der Differenz der beiden anderen Räume.

Der große Vorteil dieser Bestimmungsmethode des ICR besteht darin, daß man die Änderungen des ICR auch unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen miterfassen kann. Solche Änderungen des ICR können z.B. eine Folge von mechanischer Zerstörung sein oder durch Schrumpfung oder Quellung der Zelle hervorgerufen werden.

**Durchführung der ICR-Bestimmung**

Nach 3o Minuten Inkubation wurden 1,o ml vom Ansatz abgenommen und sofort durch einen Millipore-Filter (Porenweite o,45 µm) filtriert. Nach jeder Filtration wurde die Apparatur sorgfältig gereinigt, um Reste von Radioaktivität sicher zu entfernen. Vom Filtrat wurden jeweils 2 x 4oo µl abgenommen, mit 1o,o ml Univolve I versetzt und im Szintillationszähler gemessen. Auch das Filterpapier wurde in ein Szintillationsgefäß gegeben und mit 1,o ml Äthylenglykolmonomethyläther aufgelöst und nach 1o Minuten 1o,o ml Unisolve I hinzugefügt.

Wegen der unterschiedlichen Zusammensetzung der Proben (Überstände und Sedimente) ergab sich ein unterschiedliches Quenchverhalten. Deshalb mußten vor der Berechnung des ICR Quenchkorrekturen durchgeführt werden, die den Counter zur Berücksichtigung bei der Berechnung der dpm eingegeben wurden (Ausdruckbeispiele im Anhang).

Aufgrund der im Szintillationszähler bestimmten Radioaktivität wurde der ICR folgendermaßen berechnet:

dpm $^{3}H$-Überstand : 4oo µl = dpm/µl $^{3}H$-Raum
dpm $^{14}C$-Überstand : 4oo µl = dpm/µl $^{14}C$-Raum
dpm $^{3}H$-Sediment : dpm/µl $^{3}H$-Raum= µl $^{3}H$-Raum-Sediment
dpm $^{14}C$-Sediment : dpm/µl $^{14}C$-Raum= µl $^{14}C$-Raum-Sediment

µl $^{3}H$-Raum Sediment - µl $^{14}C$-Raum Sediment =

µl ICR/ml Suspension

Die Ausrechnung erfolgte mit Hilfe eines Rechenprogrammes auf dem HP 96 oder HP 25 (s. Anhang, Rechenprogramme), die Ergebnisse wurden auf einem Protokollblatt festgehalten (Abb. 8).

Ein Waschen der Sedimente erwies sich als ungünstig, da dann schlecht reproduzierbare Resultate erhalten wurden.

ICR-Bestimmung isolierter Herzzellen

Präparation vom: 23.1o.8o
Ansatz Nr.: A = Normal; B = Triton
Inkubationstemperatur: 25° C

Auswertung der Messung vom: 24.1o.8o
Bemerkungen: keine

| Probe | Zeit nach Inkubationsbeginn | dpm $^{3}H_2O_{Sed.}$ | dpm $^{14}C_{Sed.}$ | dpm $^{3}H_2O$/µl Über. | dpm $^{14}C$/µl Über. | µl ICR/ml Suspens. | µl ICR/mg Prot. | µl ICR/Zelle |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A 1 | 34' | 9o432 | 1oo81 | 1528,42 | 2oo,56 | 1o,68 | 5,45 | $1,64x1o^{-5}$ |
| A 2 | 5o' | 91736 | 1o392 | 1536,19 | 198,88 | 8,96 | 4,57 | $1,38x1o^{-5}$ |
| A 3 | 65' | 9o631 | 1o226 | 1534,36 | 194,57 | 7,81 | 3,99 | $1,21x1o^{-5}$ |
| A 4 | 8o' | 881o3 | 9695 | 1532,47 | 2o2,o6 | 11,41 | 5,82 | $1,76x1o^{-5}$ |
| B 1 | 35' | 48917 | 6673 | 1525,77 | 229,o2 | 3,51 | 1,93 | $1,o1x1o^{-5}$ |
| B 2 | 5o' | 4o1o4 | 6186 | 1537,31 | 232,84 | -o,58 | -o,32 | $-1,67x1o^{-6}$ |
| B 3 | 65' | 36983 | 57o4 | 1525,17 | 229,18 | -o,77 | -o,42 | $-2,22x1o^{-6}$ |
| B 4 | 8o' | 37941 | 593o | 1497,81 | 223,44 | -1,45 | -o,8o | $-4,19x1o^{-6}$ |

**Abb. 8** Beispiel eines Protokolls zur ICR-Bestimmung isolierter Herzzellen

Untersucht wurden neben einem Kontrollansatz Ansätze mit verschiedenen Nährmedien. Der Kontrollansatz bestand aus 5,oo ml Zellsuspension, die mit je o,5 µCi $^{3}H_{2}O$ und $C^{14}$-Carboxyinulin markiert war. Durch Zugabe von Perfusionslösung II als Verdünnungslösung betrug das Endvolumen 6,oo ml (s. Anhang, Ansätze).

Ergebnisse s. Tab. 4

| | Zeit der Abnahme nach Ansatzbeginn | µl ICR/ml Susp. | µl ICR/mg Protein | µl ICR/Zelle |
|---|---|---|---|---|
| | 3o' | 1o,18 | 2,o9 | $1,28x1o^{-5}$ |
| | 55' | 15,19 | 3,13 | $1,91x1o^{-5}$ |
| | 92' | 13,97 | 2,87 | $1,76x1o^{-5}$ |
| | 15o' | 13,57 | 2,79 | $1,71x1o^{-5}$ |
| | 35' | 1o,68 | 5,45 | $1,64x1o^{-5}$ |
| | 5o' | 8,96 | 4,57 | $1,38x1o^{-5}$ |
| | 65' | 7,81 | 3,99 | $1,21x1o^{-5}$ |
| Kontrolle | 8o' | 11,41 | 5,82 | $1,76x1o^{-5}$ |
| | 3o' | 7,67 | 3,42 | $1,45x1o^{-5}$ |
| | 45' | 9,68 | 4,32 | $1,83x1o^{-5}$ |
| | 6o' | 8,75 | 3,9o | $1,65x1o^{-5}$ |
| | 3o' | 13,4o | 4,o4 | $2,o2x1o^{-5}$ |
| | 45' | 11,37 | 3,42 | $1,71x1o^{-5}$ |
| + Glucose | 6o' | 13,o4 | 3,93 | $1,97x1o^{-5}$ |
| 1o mMol/l | 75' | 11,o8 | 3,34 | $1,67x1o^{-5}$ |
| + BTS | 4o' | 14,19 | 2,67 | $1,38x1o^{-5}$ |
| 1o mMol/l | 65' | 16,47 | 3,1o | $1,61x1o^{-5}$ |
| + Glutamat | 95' | 11,56 | 2,17 | $1,13x1o^{-5}$ |
| 1o mMol/l | | | | |
| | 3o' | 13,64 | 3,o2 | $1,22x1o^{-5}$ |
| + Succinat | 59' | 12,51 | 2,77 | $1,12x1o^{-5}$ |
| 1o mMol/l | 122' | 12,44 | 2,75 | $1,11x1o^{-5}$ |
| | 156' | 13,74 | 3,o4 | $1,23x1o^{-5}$ |

**Tab. 4** Bestimmung des ICR isolierter Herzzellen in der reinen Zellsuspension und unter Zusatz verschiedener Nährmedien (jeweils 1o mMol/l)

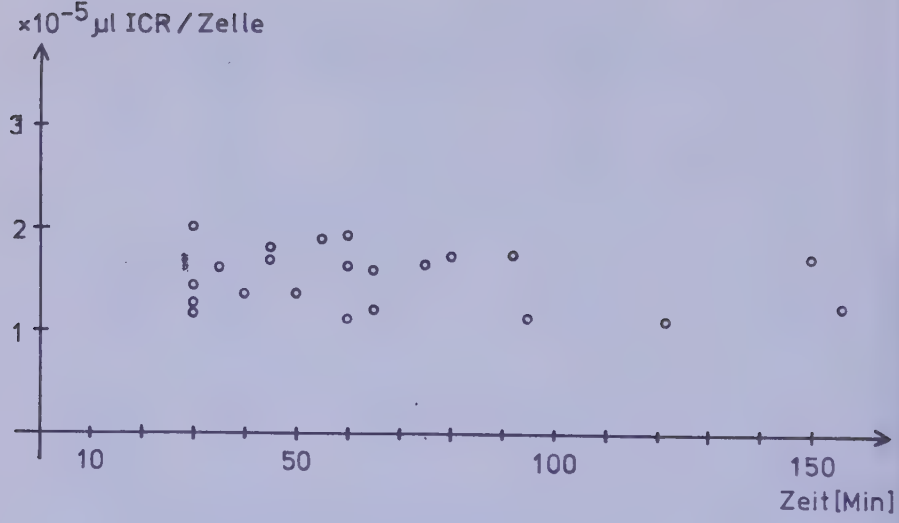



Abb. 9 ICR/Zelle in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

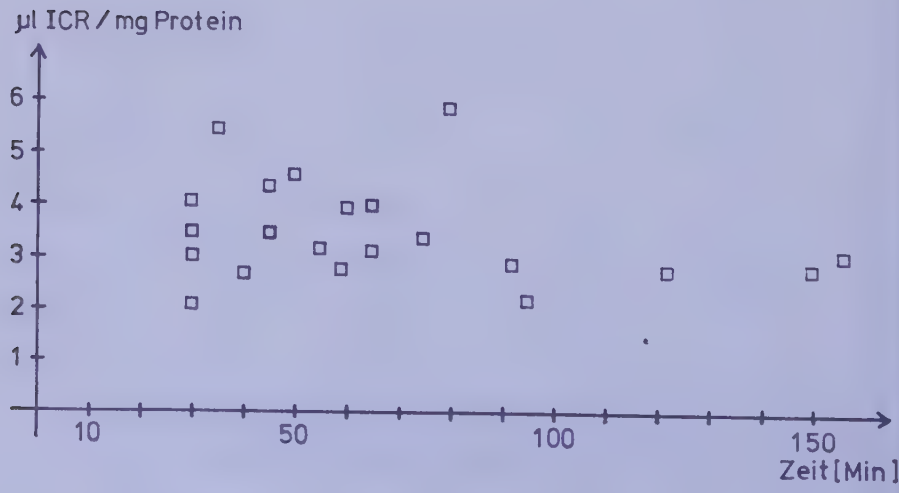



Abb. 10 ICR/mg Protein in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

In Gegenwart einer 4 %igen Triton-Lösung konnte keine ICR-Bestimmung durchgeführt werden.

Nach einer Ultraschallbehandlung des Ansatzes zur mechanischen Zerstörung der Herzzellen erhielt man folgende Ergebnisse:

| Zeit der Abnahme nach Ansatzbeginn | µl ICR/ml Susp. | µl ICR/mg Protein | µl ICR/Zelle |
|---|---|---|---|
| 3o' | 2,o3 (7,67) | o,86 (3,42) | $o,36x1o^{-5}$ ($1,45x1o^{-5}$) |
| 45' | 3,o6 (9,68) | 1,o3 (4,32) | $o,55x1o^{-5}$ ($1,83x1o^{-5}$) |
| 6o' | 1,82 (8,75) | o,77 (3,9o) | $o,33x1o^{-5}$ ($1,65x1o^{-5}$) |

(Die Ergebnisse der Kontrolle stehen in Klammern)

Tab. 5

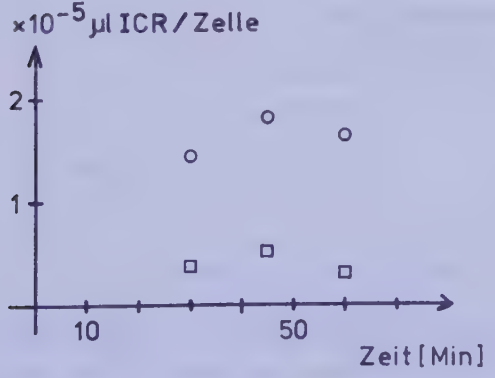



**Abb. 11** Vergleichende ICR-Bestimmung

○ = Kontrolle, □ = Probe mit Ultraschall behandelt

Bei Anwesenheit von 1,33 mMol/l $Ca^{++}_{frei}$ verkleinerte sich der ICR wie folgt: (Die Berechnung der freien $Ca^{++}$-Konzentration erfolgte nach der Formel im Anhang)

| Zeit der Abnahme nach Ansatzbeginn | µl ICR/ml Susp. | µl ICR/mg Protein | µl ICR/Zelle |
|---|---|---|---|
| 43' | 4,82 (16,93) | 1,25 (4,39) | $o,63x1o^{-5}$ ($2,2ox1o^{-5}$) |
| 73' | 3,69 (16,88) | o,96 (4,37) | $o,48x1o^{-5}$ ($2,2ox1o^{-5}$) |
| 12o' | 1,5o (16,97) | o,39 (4,4o) | $o,2ox1o^{-5}$ ($2,21x1o^{-5}$) |

(Die Ergebnisse der Kontrolle stehen in Klammern).

Tab. 6

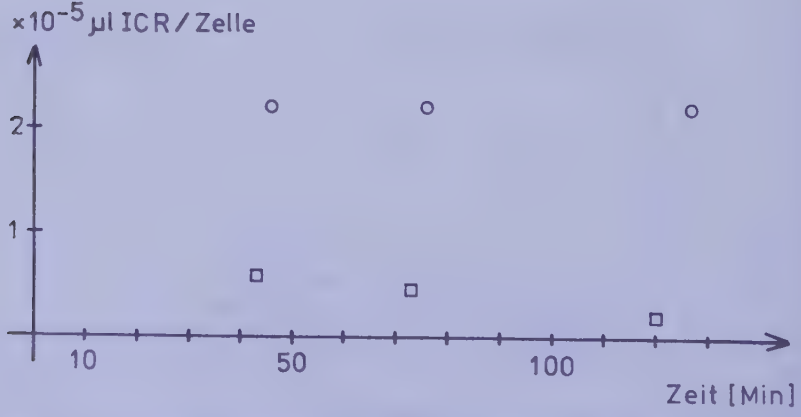



Abb. 12 Vergleichende ICR-Bestimmung

○ = Kontrolle, □ = Kontrolle + 1,33 mMol/l $Ca^{++}_{frei}$

**Auswertung**

Die Doppelmarkierung der Zellproben mit $^{3}H_2O$ und $^{14}C$-Carboxyinulin erwies sich als sehr exakte Methode zur Bestimmung des ICR. Für die Exaktheit der Methode sprachen die Untersuchungen an mechanisch oder chemisch geschädigten Zellen. Nach Behandlung mit Triton 4 %ig (o,13 % EK!), das die Zellmembranen auflöste, konnte man erwartungsgemäß kein ICR mehr nachweisen. Bei mechanischer Zerstörung durch Ultraschall hingegen wurde noch ein kleiner ICR nachgewiesen, allerdings sehr viel kleiner als im Kontrollversuch. Dies erklärte sich durch den Zusammenschluß kleiner Zelltrümmer, die dadurch einen ICR vortäuschten, der auch mikroskopisch nachgewiesen werden konnte (Abb. 11; Tab. 5).

Die Ergebnisse der ICR-Bestimmungen zeigen, daß die Bestimmung des ICR/Zelle (mittels Doppelmarkierung) konstanter ist als die Bestimmung des ICR/mg Protein (s. Abb. 9 und Abb. 1o).

Als Mittelwert fanden wir:

**ICR/Zelle** = $1{,}53 \times 10^{-5}$ µl
**ICR/mg Protein** = 3,48 µl

Der ICR blieb auch bei Verwendung unterschiedlicher Nährmedien konstant, solange keine $Ca^{++}$ im Ansatz

vorhanden war. In Gegenwart von Calcium-Ionen nahm der ICR der einzelnen Herzzellen deutlich ab. Dies dürfte einerseits auf einer Kontraktion der Zellen in Gegenwart von Calcium beruhen, andererseits ist es die Folge eines verstärkten Zelluntergangs bzw. einer Schädigung der Zellmembran
(s. Tab. 6, Abb. 12).

Stoffwechseluntersuchungen an isolierten Herzzellen setzen also eine simultane ICR-Bestimmung voraus.

### 3. Bestimmung des Calciumaustausches

Zur Bestimmung des Calciumaustausches zwischen dem Medium und den isolierten Herzzellen wurde dem Versuchsansatz neben einer physiologischen Konzentration an Calcium-Ionen (1,3 mMol/l $Ca^{++}_{frei}$) radioaktiv markiertes Calcium ($^{45}Ca^{++}$) als Markerion zugesetzt.

Das am Anfang ausschließlich im Extrazellulärraum verteilte $^{45}Ca^{++}$ wird zeitabhängig mit dem intrazellulären unmarkierten Calcium ausgetauscht, so daß es allmählich zu einer Äquilibrierung (Steady-State) zwischen innen und außen kommt. Da der Calcium-Ionen-Transport durch die Zellmembranen unter physiologischen Bedingungen an ganz bestimmte Austauschmechaniken gebunden ist, kann aus der Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung auf die Intaktheit der Zelle geschlossen werden. Über den reinen Calcium-Ionen-Austausch hinaus, prüften wir auch, welchen Einfluß bestimmte Substrate auf diesen Transport ausübten.

Der Kontrollansatz bestand aus 5,oo ml Zellsuspension, die mit jeweils o,5 µCi $^{3}H_2O$ und $^{45}Ca^{++}$markiert war. Zusätzlich enthielt der Ansatz 1,33 mMol/l $Ca^{++}_{frei}$ und wurde mit Perfusions-Lösung II als Verdünnungslösung auf 6,oo ml Endvolumen ergänzt. Zusätzlich zum Kontrollansatz (a) wurden Ansätze untersucht, die folgende Zusätze enthielten:

b) Lanthan (o,5 mMol/l)
c) Triton (o,4 % EK!)
d) Atractylosid (1o,6 mMol/l)
e) Antimycin-A ($3,75 \times 1o^{-7}$ Mol/l)
f) g-Strophanthin ($1o^{-7}$ Mol/l)

Der Ansatz für die Bestimmung des Calciumsaustausches wurde während des Experimentes durch einen Magnetrührer kontinuierlich in Bewegung gehalten, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen im Ansatz zu erreichen. Die erste Probenentnahme von o,5 ml erfolgte 1 Minute nach Zugabe der Calcium-Ionen. Die weiteren Probenentnahmen erfolgten in Abständen von 1o Minuten. Nach der Entnahme wurden die Proben durch ein Millipore-Filter filtriert. Vom Filtrat wurden 2x15o µl (Doppelbestimmung) abgenommen und jeweils mit 1o,o ml Unisolve I in ein Szintillationsgefäß gegeben. Das Filterpapier mit dem Sediment wurde wie bei der ICR-Bestimmung in einem Szintillationsgefäß mit 1,o ml Äthylenglykolmonomethyläther aufgelöst und nach 1o Minuten mit 1o,o ml Unisolve I aufgefüllt. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte nach mehrstündiger Lagerung in einem dunklen Raum in einem Beckmann-Szintillationszähler LS 9ooo.

Wie bei der ICR-Bestimmung war die Aufstellung von Quenchkorrekturkurven notwendig, um die Zählergebnisse für den Überstand und das Sediment quantitativ verrgleichen zu können.
(Ausdruck-Beispiele im Anhang)

Berechnung des $^{45}Ca^{++}$-Gehaltes/µl ICR (in dpm):

Channel 2 Überstand : 15o *1 = dpm $^{45}Ca^{++}$/µl Überstand

Channel 1 Überstand : 15o = dpm $^{3}H_2O$/µl Überstand

ICR x dpm $^{3}H_2O$/µl Überstand = dpm $^{3}H_2O_{ICR}$

dpm $^{3}H_2O_{Sediment}$ - dpm $^{3}H_2O_{ICR}$ = dpm $^{3}H_2O_{ECR}$

dpm $^{3}H_2O_{ECR}$ : dpm $^{3}H_2O$/µl Überstand = µl ECR

µl ECR x dpm $^{45}Ca^{++}$/µl Überstand = dpm $^{45}Ca^{++}_{ECR}$

dpm $^{45}Ca^{++}_{Sediment}$ - dpm $^{45}Ca^{++}_{ECR}$ = dpm $^{45}Ca^{++}_{ICR}$

dpm $^{45}Ca^{++}_{ICR}$ : ICR = $\underline{\text{dpm } ^{45}Ca^{++}\text{/µl ICR}}$

*1 = vom Filtrat zur Untersuchung entnommene µl

Die Ausrechnung erfolgte mit Hilfe eines Rechenprogramms für den HP 96 oder HP 25 (s. Anhang, Rechenprogramme), die Ergebnisse wurden auf einem Protokollblatt festgehalten (Abb. 13).

Berechnung des $Ca^{++}$-Austausches isolierter Herzzellen

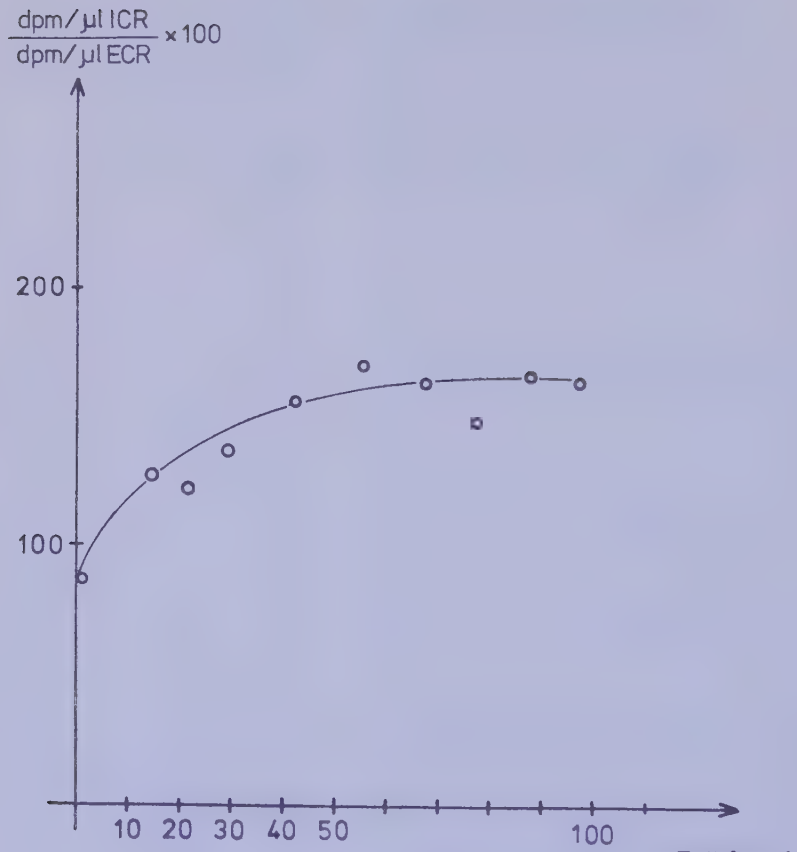
Präparation vom: o5.11.8o
Ansatz Nr.: a
Inkubationstemperatur: 25° C.
Auswertung der Messung vom: o6.11.8o

| Probe | Zeit nach Inkubationsbeginn | dpm $^3H_2O$ Sed. | dpm $^{45}Ca^{++}$ Sed. | µl ECR | dpm $^{45}Ca^{++}$/µl ICR | dpm $^{45}Ca^{++}$/µl ECR | dpm $^3H_2O$/µl ECR | $\frac{100 \times dpm\ ^{45}Ca^{++}/\mu l\ ICR}{dpm\ ^{45}Ca^{++}/\mu l\ ECR}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 25' | 7o2o8 | 29999 | 4o,33 | 418,4o | 476,45 | 15oo,95 | 87,82 |
| 2 | 15'25'' | 7815o | 36o41 | 44,62 | 591,4o | 466,15 | 153o,41 | 126,87 |
| 3 | 22' | 71495 | 342o6 | 39,4o | 587,42 | 484,o1 | 1559,7o | 121,36 |
| 4 | 3o' | 749o1 | 36365 | 41,o6 | 649,37 | 478,o5 | 1576,63 | 135,84 |
| 5 | 43' | 76o44 | 37966 | 42,11 | 718,81 | 461,69 | 1566,19 | 155,69 |
| 6 | 56' | 7856o | 4o568 | 45,15 | 781,o5 | 452,74 | 1522,75 | 172,52 |
| 7 | 68' | 71633 | 37659 | 4o,3o | 746,66 | 456,97 | 1532,39 | 163,39 |
| 8 | 78' | 77712 | 375o8 | 43,9o | 672,51 | 459,61 | 1543,62 | 146,32 |
| 9 | 88' | 71o31 | 36514 | 38,37 | 744,14 | 451,83 | 1585,o1 | 164,7o |
| 1o | 98' | 754o1 | 38365 | 41,39 | 75o,13 | 459,82 | 1576,19 | 163,14 |

**Abb. 13** Beispiel eines Versuchsprotokolls zum $Ca^{++}$-Austausch isolierter Herzzellen

**Ergebnisse**

Die Bestimmung der Kinetik des Calciumaustausches im Kontrollansatz (a) ergab, daß bereits innerhalb der ersten Minute nach Zugabe zur Zellsuspension ein hoher Prozentsatz des Calciums ausgetauscht wurde. Die Austauschrate stieg danach kontinuierlich weiter an, bis nach etwa 8o Minuten ein steady-state erreicht wurde (Abb. 14)




$Ca^{++}$-Austausch im Kontrollansatz (a).

**Abb. 14** Zeitlicher Verlauf der intrazellulären Anreicherung von $^{45}Ca^{++}$ im Vergleich zur Anfangskonzentration.
Hohe Austauschrate innerhalb der 1. Minute nach Zugabe der $Ca^{++}$-Lösung.
Steady-state nach etwa 8o Minuten.

In einem weiteren Ansatz wurde die Zuverlässigkeit der Untersuchungsmethode wie folgt überprüft:

Der Calciumaustausch wurde wie beschrieben über 15 Minuten ausgeführt. Dann wurde der Ansatz geteilt. Zu einer Hälfte kam 4 %iges Triton (o,4 % EK!), zur anderen Hälfte das entsprechende Volumen der normalen Verdünnungslösung. Dann wurde der Calciumaustausch in beiden Ansatzhälften für weitere 7o Minuten verfolgt. Wir fanden, daß in Gegenwart von Triton, das die Zellen nachweislich rasch zerstört, die Austauschkinetik fast auf die Anfangsbedingungen (1 Minute nach Ansatzbeginn) zurückfiel. Dabei erfolgte in der anderen Ansatzhälfte ein normaler Austausch (Abb. 15).

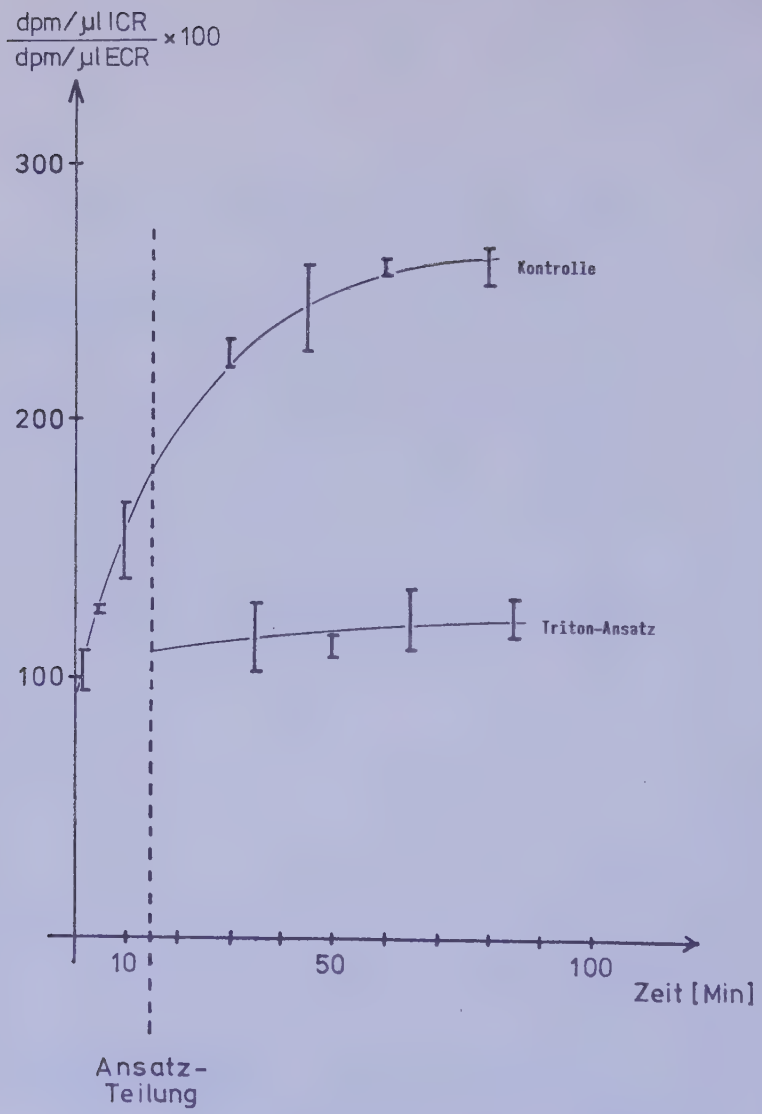



**Abb. 15** $Ca^{++}$-Austausch nach Teilung des Kontrollansatzes, wobei eine Ansatzhälfte mit Triton (0,4 % EK!) versetzt und dadurch die im Ansatz vorhandenen isolierten Herzzellen zerstört wurden (Auflösung der Zellmembranen).

Bestimmungen des $Ca^{++}$-Austausches in einem kürzeren Zeitraum als 1 Minute waren aus technischen Gründen nicht möglich.

Bei den Untersuchungen, welche Einflüsse verschiedene Substanzen auf die Calciumaufnahme ausübten, erhielten wir folgende Ergebnisse:

In Gegenwart von Lanthan (o,5 mMol/l) zeigte sich eine deutlich höhere intrazelluläre Calciumanreicherung (Abb. 16). Zusatz von Atractylosid ($1o^{-6}$ Mol/l) oder Antimycin-A (3,75 x $1o^{-7}$ Mol/l) führten zu einer deutlich geringeren intrazellulären Calciumanreicherung (Abb. 17 und 18). g-Strophanthin führte, ebenso wie Lanthan, zu einer vermehrten Calcium-Ionen-Anreicherung im Intrazellulärraum (Abb. 19).

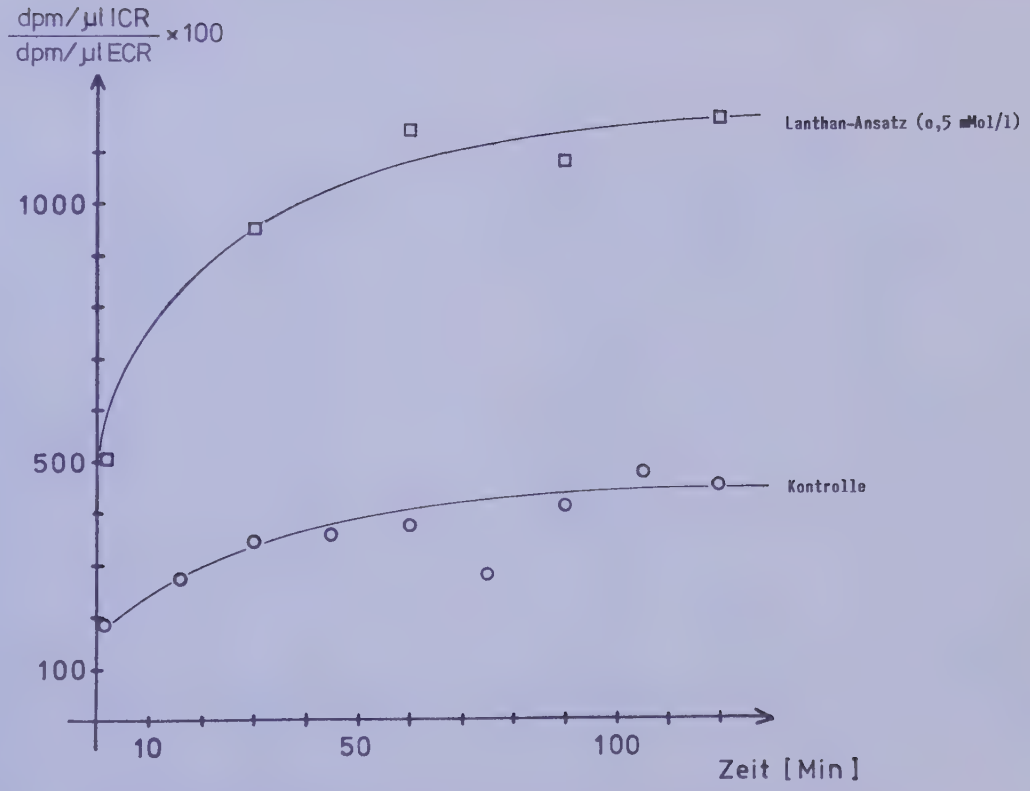



**Abb. 16** Zeitlicher Verlauf der intrazellulären Anreicherung von $^{45}Ca^{++}$ unter Zusatz von $La_2Cl_3$ (o,5 mMol/l) im Vergleich zum Kontrollansatz.

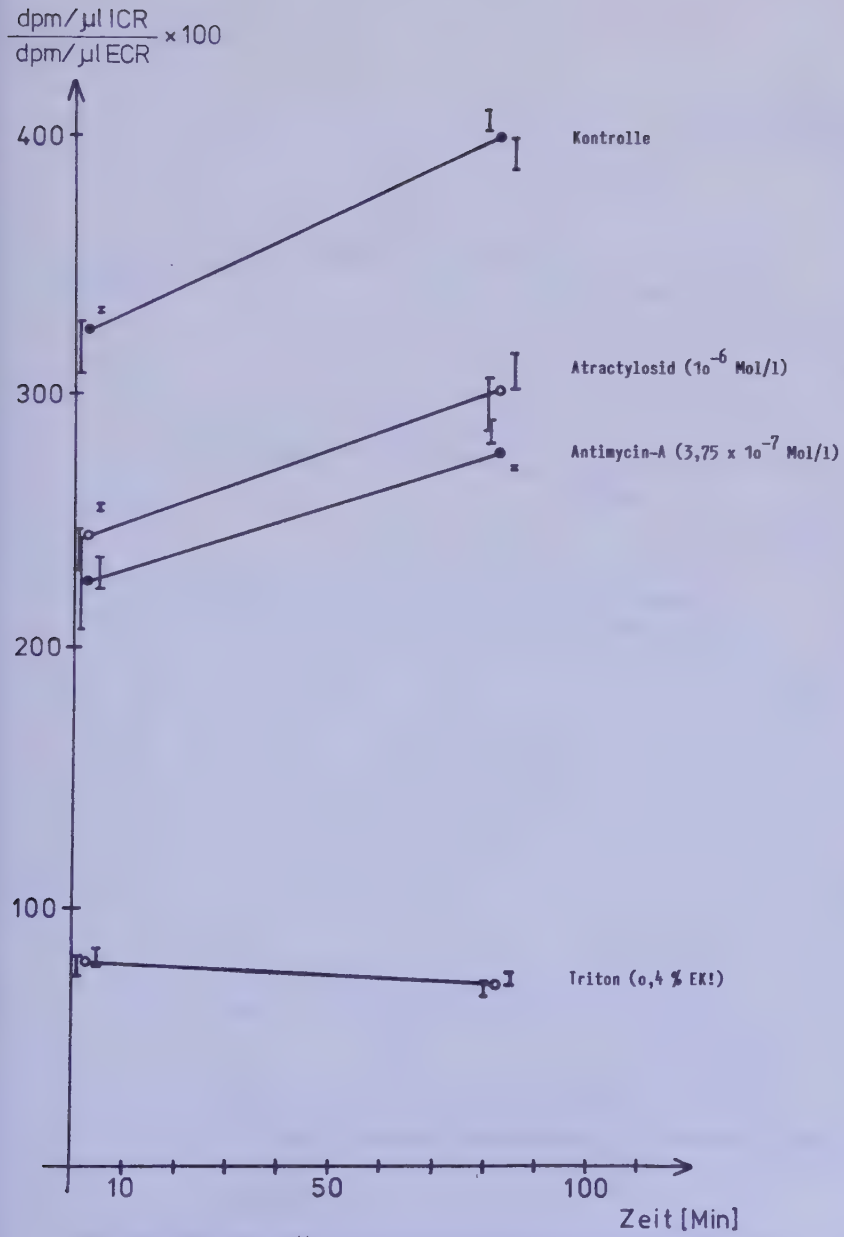



**Abb. 17** Intrazelluläre $Ca^{++}$ -Anreicherung im Vergleich zur Anfangskonzentration unter dem Einfluß von Atractylosid, Antimycin-A und Triton.

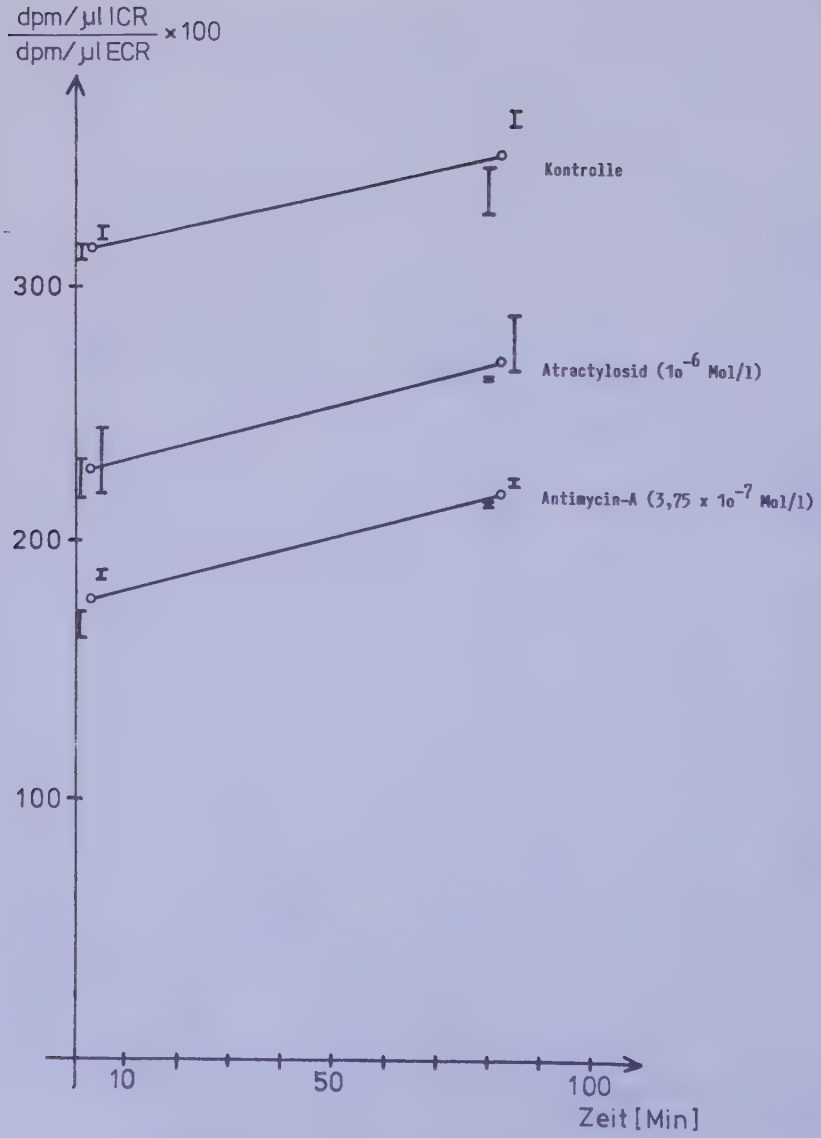



**Abb. 18** Intrazelluläre $Ca^{++}$-Anreicherung im Vergleich zur Anfangskonzentration unter dem Einfluß von Atractylosid und Antimycin-A

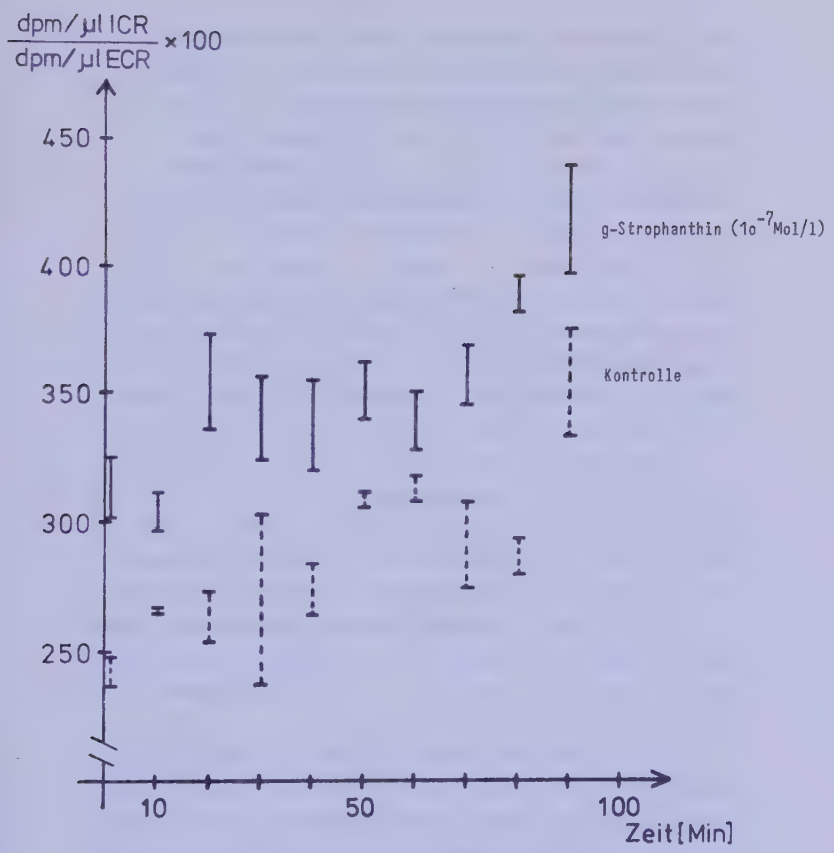



**Abb. 19** Erhöhung der intrazellulären $Ca^{++}$-Konzentration im Vergleich zur Anfangskonzentration durch g-Strophanthin.

## Zusammenfassung und Diskussion

Es wird über die Herstellung einer Herzzellsuspension durch enzymatische Zerlegung eines Meerschweinchenherzens in einzelne, intakte Herzzellen berichtet. Die Haltbarkeit dieser Suspension wurde unter verschiedenen Inkubationsbedingungen überprüft und grundlegende Versuche unternommen, um die Eignung dieser Herzzellsuspension für biochemische und pharmakologische Fragestellungen zu überprüfen. Dazu gehörte die radioaktive Bestimmung des ICR durch Doppelmarkierung mit $^{3}H_2O$ und $^{14}C$-Carboxyinulin sowie die Bestimmung des $Ca^{++}$-Austausches durch Doppelmarkierung mit $^{3}H_2O$ und $^{45}Ca^{++}$ unter dem Einfluß verschiedener Substanzen.

Die von uns nach den Angaben von Clark et al. (3) durchgeführte Präparation erwies sich als gute Methode zur Herstellung einer Herzzellsuspension mit einzelnen, intakten Herzmuskelzellen. Die Ausbeute an intakten Zellen lag bei der beschriebenen Methode mit 9o % ähnlich hoch wie bei Clark und damit erheblich höher als bei den von anderen Autoren beschriebenen Methoden (1; 4; 7; 1o; 22), wobei alle Autoren die Trypan-Blaufärbung als Indikator für zerstörte Zellen zugrunde legten. Unter Inkubation bei 2°C erfolgte in der reinen Suspension keine Abnahme an intakten Zellen (Abb. 6 c). Bei 25°C bzw. 37°C zeigte sich dagegen eine lineare Abnahme der intakten Zellen mit der Zeit, wobei auch ein Zelluntergang in Gegenwart von $Ca^{++}$ zu beobachten ist (15; 17; 18; 21; 24; Abb. 6 a, b). In unseren Untersuchungsansätzen (Glucose 1o mMol/l; $Ca^{++}$ 1,3 mMol/l) zeigte sich eine lineare Abnahme

der intakten Zellen (3o % in 3 Stunden, Abb. 7), was bei länger dauernden biochemischen und pharmakologischen Untersuchungen berücksichtigt werden muß.

Ebenso ist dabei der Einfluß der durch $Ca^{++}$ hervorgerufenen Zellkontraktion auf den ICR zu berücksichtigen. Daher setzen Stoffwechseluntersuchungen an isolierten Herzzellen eine simultane ICR-Bestimmung voraus. Als Mittelwert für den ICR einer Meerschweinchenherzzelle konnten 1,53 x $1o^{-5}$ µl festgestellt werden.

Die experimentelle Verwendbarkeit einer Herzzellsuspension wurde anhand des Calciumaustausches unter dem Einfluß verschiedener Substanzen geprüft. Die Kinetik des $Ca^{++}$-Austausches, bestimmt durch Doppelmarkierungen mit $^{3}H_2O$ und $^{45}Ca^{++}$, ergab einen kontinuierlichen Anstieg des intrazellulären Calciums, bis nach ca. 8o Minuten ein steady-state erreicht wurde (Abb. 14). Unter dem Einfluß verschiedener Substanzen konnte eine Hemmung (Atractylosid; Antimycin-A) bzw. eine Aktivierung (Lanthan; g-Strophanthin) des $Ca^{++}$-Austausches durch die Zellmenbran nachgewiesen werden (Abb. 16-19).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, daß eine Suspension einzelner Herzzellen als Modell für pharmakologische oder biochemische

Untersuchungen verwendet werden kann und eine sinnvolle Ergänzung der bereits verwendeten Modelle (Langendorf-Herz, Vorhof-Modell, etc.) darstellt. Der große Vorteil dieser Methode besteht einerseits in der verkürzten Untersuchungszeit, da mehrere Substanzen parallel an der gleichen Herzzellpräparation untersucht werden können, andererseits durch geringere Kosten, da sowohl die eingesetzten Substanzmengen als auch die Anzahl der Versuchstiere drastisch reduziert werden können.

Anhang

A. Ansätze zur ICR-Bestimmung

B. Ansätze zur $Ca^{++}$-Austausch-Bestimmung

C. Berechnung der freien $Ca^{++}$-Konzentration in einem Inkubationsmedium bei Anwendung von EGTA als Komplexbildner

D. Programm zur Eiweißbestimmung nach Biuret bei isolierten Herzzellen

E. Programm zur Ermittlung der Zellzahl

F. Programm zur ICR-Berechnung bei isolierten Herzzellen

G. Programm zur Berechnung des $Ca^{++}$-Austausches isolierter Herzzellen

H. Quenchkorrekturkurven zur ICR-Bestimmung

I. Ausdruckbeispiel (ICR-Bestimmung)

K. Quenchkorrekturkurven zur Bestimmung des $Ca^{++}$-Austausches

L. Ausdruckbeispiel ($Ca^{++}$-Austausch)

**A. Ansätze zur ICR-Bestimmung**

a) Kontrollansatz

5,oo ml Zellsuspension
o,2o ml $^{3}H_2O$-Lösung (= o,5 µCi)
o,o5 ml $^{14}C$-Carboxyinulin-Lösung (= o,5 µCi)
Perfusionslösung II ad 6,oo ml EV!

b) + o,6o ml Glucoselösung 1oo mMol (= 1o mMol/l)

c) + o,25 ml BTS 25o mMol (= 1o,42 mMol/l)
+ o,25 ml Glutamat 25o mMol (= 1o,42 mMol/l)

d) + o,25 ml Succinat 25o mMol (= 1o,42 mMol/l)

## B. Ansätze zur $Ca^{++}$-Austausch-Bestimmung

a) Kontrollansatz

5,oo ml Zellsuspension
o,14 ml $Ca^{++}$-Lösung 75 mMol, Kalt (= 1,33 mMol/l $Ca^{++}_{frei}$) - (Berechnung s. Seite 72 )
o,o5 ml $^{45}Ca^{++}$-Lösung (= o,5 µCi)
o,2o ml $^{3}H_2O$-Lösung (= o,5 µCi)
Perfusionslösung II ad 6,oo ml EV!

b) + o,3o ml $LaCl_3$-Lösung 1o mMol (= o,5 mMol/l)

c) + o,6o ml Triton 4% (= o,4 % EK!)

d) + o,3o ml Atractylosid-Lösung 2 x $1o^{-5}$Mol
(= $1o^{-6}$Mol/l)

e) +o,4o ml Antimycin-A-Lösung 5,63 x $1o^{-6}$ Mol
(= 3,75 x $1o^{-7}$ Mol/L)

f) + o,6o ml g-Strophanthin-Lösung $1o^{-6}$ Mol
(= $1o^{-7}$ Mol/l)

C. Berechnung der freien $Ca^{++}$-Konzentration in einem Inkubationsmedium bei Anwendung von EGTA als Komplexbildner

$$Ca_{Tot.} = \frac{Ca_{frei} \cdot (EGTA_{Tot.} + Ca_{frei} + K°)}{K° + Ca_{frei}}$$

$$EGTA_{frei} = EGTA_{Tot.} \cdot K° + z^2 - z$$

$$z = \frac{Ca_{Tot.} + K° - EGTA_{Tot.}}{2}$$

$$Ca_{frei} = Ca_{Tot.} + EGTA_{frei} - EGTA_{Tot.}$$

$$Ca \cdot EGTA = Ca_{Tot.} - Ca_{frei}$$

$$Ca_{frei} = K° (Ca_{Tot.} - 1) + \left(\frac{EGTA_{Tot.} - Ca_{Tot.}}{2}\right)^2 - \frac{EGTA_{tot.} - Ca_{Tot.}}{2}$$

---

$Ca_{Tot.}$ = Konzentration des Gesamtcalciums (µMol/l)

$Ca_{frei}$ = freier "ionisierter" $Ca^{2+}$-Anteil (µMol/l)

$EGTA_{frei}$ = freies, ungebundenes EGTA (µMol/l)

Ca EGTA = an EGTA gebundenes Calcium (µMol)

K° = 2,2727

$EGTA_{Tot.}$ = eingesetztes EGTA (µMol/l)

## D. Programm zur Eiweißbestimmung nach Biuret bei isolierten Herzzellen (HP 25)

| Tasten | Anzeige Schritt | Code |
|---|---|---|
| RCL 1 | o1 | 24o1 |
| RCL 2 | o2 | 24o2 |
| - | o3 | 41 |
| RCL 3 | o4 | 24o3 |
| Enter | o5 | 31 |
| RCL 2 | o6 | 24o2 |
| - | o7 | 41 |
| : | o8 | 71 |
| RCL 4 | o9 | 24o4 |
| x | 1o | 61 |
| RCL 5 | 11 | 24o5 |
| x | 12 | 61 |
| RCL 6 | 13 | 24o6 |
| : | 14 | 71 |
| R/S | 15 | 74 |

| Register | |
|---|---|
| o | frei |
| 1 | $E_{Zellsuspension}$ |
| 2 | $E_{Lösungsmittel}$ |
| 3 | $E_{Standard}$ |
| 4 | mg Protein/ml Standard |
| 5 | ml Ansatz |
| 6 | ml Zellsuspension pro Ansatz |
| 7 | frei |

## Berechnung des Eiweißgehaltes isolierter Herzzellen nach Biuret

| Nr. | Anweisung | Eingabedaten | Tasten | Ausgabeanzeige |
|---|---|---|---|---|
| 1. | Programm eintasten | | | |
| 2. | Speicher löschen | | f REG | |
| 3. | Speicher füllen | $E_{Zellsusp.}$ | STO 1 | |
| | | $E_{Lösungsm.}$ | STO 2 | |
| | | $E_{Standard}$ | STO 3 | |
| | | mg Prot./ml Stand. | STO 4 | |
| | | ml Ansatz | STO 5 | |
| | | ml Zellsusp./ Ansatz | STO 6 | |
| 4. | Eiweißberechnung | | R/S | Eiweiß/ml Zellsusp. |
| 5. | Für weitere Berechnung entsprechenden Speicher ändern, an Programmanfang gehen und Programm starten | | R/S | |

## E. Programm zur Ermittlung der Zellzahl

| Tasten | Anzeige Schritt | Code | Tasten | Anzeige Schritt | Code |
|---|---|---|---|---|---|
| + | o1 | 51 | RCL 4 | 15 | 24 o4 |
| R↓ | o2 | 22 | x | 16 | 61 |
| + | o3 | 51 | RCL 2 | 17 | 24 o2 |
| R↓ | o4 | 22 | : | 18 | 71 |
| + | o5 | 51 | STO 3 | 19 | 23 o3 |
| R↓ | o6 | 22 | R/S | 2o | 74 |
| + | o7 | 51 | RCL 1 | 21 | 24 o1 |
| STO + o | o8 | 23 51 oo | 2 | 22 | o2 |
| R/S | o9 | 74 | : | 23 | 71 |
| RCL o | 1o | 24 oo | RCL 5 | 24 | 24 o5 |
| 2 | 11 | o2 | x | 25 | 61 |
| : | 12 | 71 | RCL 4 | 26 | 24 o4 |
| RCL 5 | 13 | 24 o5 | x | 27 | 61 |
| x | 14 | 61 | RCL 2 | 28 | 24 o2 |

| Register | |
|---|---|
| o | Gesamtsumme aller Zellen aus 2 Zählungen |
| 1 | Gesamtsumme aller zerstörten Zellen aus 2 Zählungen |
| 2 | ml Zellsusp. pro Ansatz |
| 3 | Zellzahl/ml Zellsusp. |
| 4 | ml Ansatz |
| 5 | 3ooo *1 |

*1 = Faktor bei Verdünnung 5+1!
(5 Teile Suspension + 1 Teil Trypan-Blau)

**Programm zur Ermittlung der Zellzahl** -Fortsetzung-

| Tasten | Anzeige Schritt | Code | Tasten | Anzeige Schritt | Code |
|---|---|---|---|---|---|
| : | 29 | 71 | x | 38 | 61 |
| R/S | 3o | 74 | RCL 3 | 39 | 24 o3 |
| RCL 3 | 31 | 24 o3 | : | 4o | 71 |
| x⇄y | 32 | 21 | R/S | 41 | 74 |
| - | 33 | 41 | o | 42 | oo |
| R/S | 34 | 74 | STO o | 43 | 23 oo |
| 1 | 35 | o1 | STO 1 | 44 | 23 o1 |
| o | 36 | oo | R/S | 45 | 74 |
| o | 37 | oo | | | |

## Programm zur Ermittlung der Zellzahl

| Nr. | Anweisung | Eingabedaten | Tasten | Ausgabeanzeige |
|---|---|---|---|---|
| 1. | Programm eintasten | | | |
| 2. | Speicher löschen | | f REG | |
| 3. | Speicher füllen | | | |
| | ml Ansatz | ml Ansatz | STO 4 | |
| | | ml Zellsuspension pro Ansatz | STO 2 | |
| | | 3ooo *1 | STO 5 | |
| 4. | 1. Zählung | 1. Quadrat | Enter | |
| | | 2. Quadrat | Enter | |
| | | 3. Quadrat | Enter | |
| | | 4. Quadrat | R/S | Gesamtsumme aller Zellen der 1. Zählung |
| 5. | An Programmanfang gehen | | f PRGH | |

**Programm zur Ermittlung der Zellzahl**
-Fortsetzung-

| Nr. | Anweisung | Eingabedaten | Tasten | Ausgabeanzeige |
|---|---|---|---|---|
| 6. | Zählung der zerstörten Zellen 1. Zählung | Zellzahl | STO 1 | |
| 7. | 2. Zählung | 1. Quadrat | Enter | |
| | | 2. Quadrat | Enter | |
| | | 3. Quadrat | Enter | |
| | | 4. Quadrat | R/S | Gesamtsumme aller Zellen der 2. Zählung |
| 8. | Zählung der zerstörten Zellen 2. Zählung | Zellzahl | STO + 1 | |
| 9. | Ausrechung | | R/S | Zellzahl pro Suspension |
| | | | R/S | zerstörte Zellen pro ml Suspension |

**Programm zur Ermittlung der Zellzahl**
-Fortsetzung-

| Nr. | Anweisung | Eingabedaten | Tasten | Ausgabeanzeige |
|---|---|---|---|---|
| | | | R/S | intakte Zellen pro ml Suspension |
| | | | R/S | % intakte Zellen |
| 10. | Speicher 0 und 1 löschen | | R/S | 0,00 |
| 11. | Zur nächsten Zählung bei 4. beginnen! | | | |
| 12. | Falls sich die Ansatzbedingungen ändern, bei 2. neu beginnen | | | |

## F. Programm zur ICR-Berechnung bei isolierten Herzzellen

| Tasten | Anzeige Schritt | Code | Tasten | Anzeige Schritt | Code |
|---|---|---|---|---|---|
| + | 01 | 51 | RCL 6 | 16 | 24 06 |
| 2 | 02 | 02 | : | 17 | 71 |
| : | 03 | 71 | R/S | 18 | 74 |
| RCL 6 | 04 | 24 06 | RCL 2 | 19 | 24 02 |
| : | 05 | 71 | x⇄y | 20 | 21 |
| R/S | 06 | 74 | : | 21 | 71 |
| RCL 1 | 07 | 24 01 | RCL 0 | 22 | 24 00 |
| x⇄y | 08 | 21 | x⇄y | 23 | 21 |
| : | 09 | 71 | - | 24 | 41 |
| STO 0 | 10 | 23 00 | RCL 7 | 25 | 24 07 |
| 0 | 11 | 00 | x | 26 | 61 |
| R/S | 12 | 74 | STO 3 | 27 | 23 03 |
| + | 13 | 51 | R/S | 28 | 74 |
| 2 | 14 | 02 | RCL 4 | 29 | 24 04 |
| : | 15 | 71 | : | 30 | 71 |

Register

| | |
|---|---|
| 0 | µl $^{3}$H-Raum Sediment |
| 1 | dpm Ch 1 Sediment |
| 2 | dpm Ch 2 Sediment |
| 3 | µl ICR/ml Suspension |
| 4 | mg Protein/ml Susp. |
| 5 | Zellzahl/ml Susp. |
| 6 | vom Überstand abgenommene µl |
| 7 | Verdünnungskorrekturfaktor |

**Programm zur ICR-Berechnung bei isolierten Herzzellen**
-Fortsetzung-

| Tasten | Anzeige | |
|---|---|---|
| | Schritt | Code |
| R/S | 31 | 74 |
| RCL 3 | 32 | 24 03 |
| RCL 5 | 33 | 24 05 |
| : | 34 | 71 |
| R/S | 35 | 74 |

**Programm zur ICR-Berechnung bei isolierten Herzzellen (HP 25)**

| Nr. | Anweisung | Eingabedaten | Tasten | Ausgabeanzeige |
|---|---|---|---|---|
| 1. | Programm eintasten | | | |
| 2. | Speicher löschen | | f REG | |
| 3. | Speicher füllen | mg Protein pro ml Suspension | STO 4 | |
| | | Zellzahl pro ml Suspension | STO 5 | |
| | | vom Überstand abgenommene µl | STO 6 | |
| | | Verdünnungskorrekturfaktor | STO 7 | |
| 4. | dpm des Sediments eingeben | dpm Ch 1 Sediment | STO 1 | |
| | | dpm Ch 2 Sediment | STO 2 | |
| 5. | dpm $^3H_2O$ vom Überstand eingeben | dpm $^3H_2O$ Überstand 1 (Ch1) | Enter | |
| | | dpm Ch 1 Überstand 2 | | |

**Programm zur ICR-Berechnung bei isolierten Herzzellen (HP 25)** -Fortsetzung-

| Nr. | Anweisung | Eingabedaten | Tasten | Ausgabeanzeige |
|---|---|---|---|---|
| 6. | Berechnung | | R/S | Mittelwert dpm $^{3}H_2O$/µl Überstand |
| | | | R/S | 0,00 |
| 7. | dpm $^{14}C$ vom Überstand eingeben | dpm Ch 2 Überstand 1 | Enter | |
| | | dpm Ch 2 Überstand 2 | | |
| 8. | Berechnung | | R/S | Mittelwert dpm $^{14}C$/µl Überstand |
| | | | R/S | µl ICR/ml Suspension |
| | | | R/S | µl ICR/mg Protein |
| | | | R/S | µl ICR/Zelle |
| 9. | Zur Berechnung der nächsten Probe an Programmanfang gehen | | f PRGM | |
| | und bei 4. wieder anfangen! | | | |

## G. Programm zur Berechnung des $Ca^{++}$-Austausches isolierter Herzzellen

| Tasten | Anzeige Schritt | Code | Tasten | Anzeige Schritt | Code |
|---|---|---|---|---|---|
| STO 4 | o1 | 23 o4 | : | 16 | 71 |
| R↓ | o2 | 22 | RCL 2 | 17 | 24 o2 |
| STO 3 | o3 | 23 o3 | : | 18 | 71 |
| R↓ | o4 | 22 | STO 5 | 19 | 23 o5 |
| STO + 4 | o5 | 23 51 o4 | o | 2o | oo |
| R↓ | o6 | 22 | R/S | 21 | 74 |
| STO + 3 | o7 | 23 51 o3 | STO 4 | 22 | 23 o4 |
| RCL 3 | o8 | 24 o3 | R | 23 | 22 |
| 2 | o9 | o2 | STO 3 | 24 | 23 o3 |
| : | 1o | 71 | RCL 6 | 25 | 24 o6 |
| RCL 2 | 11 | 24 o2 | RCL o | 26 | 24 oo |
| : | 12 | 71 | x | 27 | 61 |
| STO 6 | 13 | 23 o6 | RCL 1 | 28 | 24 o1 |
| RCL 4 | 14 | 24 o4 | x | 29 | 61 |
| 2 | 15 | o2 | RCL 3 | 3o | 24 o3 |

| Register | |
|---|---|
| o | µl ICR/ ml Susp. |
| 1 | zur Bestimmung abgenommene ml |
| 2 | vom Überstand ab- |
| 3 | benutzt |
| 4 | benutzt |
| 5 | dpm $^{45}Ca^{++}$/µl Überstand |
| 6 | dpm $^{3}H_2O$/µl Überstand |
| 7 | frei |

**Programm zur Berechnung des $Ca^{++}$-Austausches isolierter Herzzellen** - Fortsetzung -

| Tasten | Anzeige Schritt | Code | Tasten | Anzeige Schritt | Code |
|---|---|---|---|---|---|
| : | 16 | 71 | x⇄y | 31 | 21 |
| RCL 2 | 17 | 24 o2 | - | 32 | 41 |
| : | 18 | 71 | RCL 6 | 33 | 24 o6 |
| STO 5 | 19 | 23 o5 | : | 34 | 71 |
| o | 2o | oo | R/S | 35 | 74 |
| R/S | 21 | 74 | RCL 5 | 36 | 24 o5 |
| STO 4 | 22 | 23 o4 | x | 37 | 61 |
| R↓ | 23 | 22 | RCL 4 | 38 | 24 o4 |
| STO 3 | 24 | 23 o3 | x⇄y | 39 | 21 |
| RCL 6 | 25 | 24 o6 | - | 4o | 41 |
| | | | RCL o | 41 | 24 oo |
| | | | : | 42 | 71 |
| | | | RCL 1 | 43 | 24 o1 |
| | | | x | 44 | 61 |

**Programm zur Berechnung des $Ca^{++}$-Austausches isolierter Herzzellen** - Fortsetzung-

| Tasten | Anzeige Schritt | Code |
|---|---|---|
| R/S | 45 | 74 |
| RCL 5 | 46 | 24 05 |
| R/S | 47 | 74 |
| RCL 6 | 48 | 24 06 |
| R/S | 49 | 74 |

## Programm zur Berechnung des $Ca^{++}$-Austausches isolierter Herzzellen (HP 25)

| Nr. | Anweisung | Eingabedaten | Tasten | Ausgabeanzeige |
|---|---|---|---|---|
| 1. | Programm eintasten | | | |
| 2. | Speicher löschen | | f REG | |
| | | | f STK | |
| 3. | Speicher füllen | µl ICR pro ml Susp. | STO 0 | |
| | | vom Ansatz abgenommene ml | STO 1 | |
| | | vom Überstand abgenommene µl | STO 2 | |
| 4. | dpm vom Überstand eingeben | dpm Ch 1 Überstand 1 | Enter | |
| | | dpm Ch 2 Überstand 1 | Enter | |
| | | dpm Ch 1 Überstand 2 | Enter | |
| | | dpm Ch 2 Überstand 2 | | |
| 5. | Berechnung | | R/S | 0,00 |

**Programm zur Berechnung des $Ca^{++}$-Austausches isolierter Herzzellen** - Fortsetzung -

| Nr. | Anweisung | Eingabedaten | Tasten | Ausgabeanzeige |
|---|---|---|---|---|
| 6. | dpm vom Sediment eingeben | dpm Ch 1 Sediment | Enter | |
| | | dpm Ch 2 Sediment | | |
| 7. | Berechnung | | R/S | µl ECR vom Sediment |
| | | | R/S | dpm $^{45}Ca^{++}$ pro µl ICR |
| | | | R/S | dpm $^{45}Ca^{++}$ pro µl Überstand |
| 8. | Zur Berechnung der nächsten Probe an Programmanfang gehen | | R/S<br>f PRGM | dpm $^{3}H_2O$ pro µl Überstand |
| | und bei 4. wieder anfangen | | | |

## H. Quenchkorrekturkurven zur ICR-Bestimmung

```
1. STANDARDS ID: WACKER/ICR/SEDIMENT
2. UNK ID:  3H / 14C
   UNKNOWN NORMALIZATION FACTOR:
    CHANNEL #1:          1.00000000
    CHANNEL #2:          1.00000000
3. BKGRD CONSTANT QUENCH? Y
4. HALF LIFE(DAYS):
    ISOTOPE #1:        4492.0000
    ISOTOPE #2:     2032320.0000
5. CALCULATE COEFF.? N
6. AVERAGE BKGRD:
    CHANNEL #1:        0.000000
    CHANNEL #2:        0.000000
7. QUENCH COEFFS(A,B,C,D):
    ISOTOPE #1:
     CHANNEL #1:       68.012540,-     0.248512,-     0.000846,    0.00000157
     CHANNEL #2:        0.229379,      0.011578,-     0.000153,    0.00000068
    ISOTOPE #2:
     CHANNEL #1: -     20.113924,      1.316683,-     0.017749,    0.00007528
     CHANNEL #2:     171.048578,-      4.495842,      0.067931,-   0.00032613
8. QUENCH LIMITS(LOW,HIGH):    50, 101
```

```
1. STANDARDS ID: WACKER/ICR/UEBER
2. UNK ID: 3H/14C
   UNKNOWN NORMALIZATION FACTOR:
    CHANNEL #1:          1.00000000
    CHANNEL #2:          1.00000000
3. BKGRD CONSTANT QUENCH? Y
4. HALF LIFE(DAYS):
    ISOTOPE #1:        4492.0000
    ISOTOPE #2:     2032320.0000
5. CALCULATE COEFF.? N
6. AVERAGE BKGRD:
    CHANNEL #1:        0.000000
    CHANNEL #2:        0.000000
7. QUENCH COEFFS(A,B,C,D):
    ISOTOPE #1:
     CHANNEL #1:     166.197664,-      5.020088,      0.075345,-   0.00039473
     CHANNEL #2: -     4.433469,       0.249413,-     0.004147,    0.00002276
    ISOTOPE #2:
     CHANNEL #1:     143.741476,-      6.478242,      0.103858,-   0.00054969
     CHANNEL #2:    2239.792915,-    103.571028,      1.609908,-   0.00817559
8. QUENCH LIMITS(LOW,HIGH):    49,  76
```

**I. Ausdruckbeispiel (ICR-Bestimmung)**

```
UNKNOWN ID: 3H/14C
STANDARDS ID: WACKER/ICR/SEDIMENT

SAMP POS CH      CPM      2SX    TIME  ELTIME  HH

  1   1  1   44137.20  1.02     .86    4.47  79
         2   11744.18  1.99

ISOTOPE #1  DPM(NORM.):   97309.09 EFF(1):  43.86 EFF(2):   0.55
ISOTOPE #2  DPM(NORM.):   14176.00 EFF(1):  10.25 EFF(2):  79.05

  2   2  1   44589.01   .99     .91    6.73  79
         2   11007.69  1.99

ISOTOPE #1  DPM(NORM.):   98558.93 EFF(1):  43.86 EFF(2):   0.55
ISOTOPE #2  DPM(NORM.):   13235.55 EFF(1):  10.25 EFF(2):  79.05

  3   3  1   43638.55  1.05     .83    8.97  79
         2   12092.77  1.99

ISOTOPE #1  DPM(NORM.):   96067.23 EFF(1):  43.86 EFF(2):   0.55
ISOTOPE #2  DPM(NORM.):   14625.67 EFF(1):  10.25 EFF(2):  79.05

  4   4  1   45873.62   .97     .91   11.39  81
         2   10989.01  2.00

ISOTOPE #1  DPM(NORM.):  103221.51 EFF(1):  43.16 EFF(2):   0.56
ISOTOPE #2  DPM(NORM.):   13139.56 EFF(1):  10.10 EFF(2):  79.27
```

## K. Quenchkorrekturkurven zur Bestimmung des $Ca^{++}$-Austausches

```
1. STANDARDS ID: WACKER/45CA/SEDIMENT
2. UNK ID: 3H / 45CA
   UNKNOWN NORMALIZATION FACTOR:
    CHANNEL #1:        1.00000000
    CHANNEL #2:        1.00000000
3. BKGRD CONSTANT QUENCH? Y
4. HALF LIFE(DAYS):
    ISOTOPE #1:       4492.0000
    ISOTOPE #2:        153.0000
5. CALCULATE COEFF.? N
6. AVERAGE BKGRD:
    CHANNEL #1:       0.000000
    CHANNEL #2:       0.000000
7. QUENCH COEFFS(A,B,C,D):
    ISOTOPE #1:
     CHANNEL #1:      80.431099,-    0.649910,     0.002232,   0.0000089
     CHANNEL #2: -    88.679472,     4.777999,-    0.072918,   0.0003620
    ISOTOPE #2:
     CHANNEL #1:      85.349703,-    3.412524,     0.048577,-  0.0002270
     CHANNEL #2:     877.946254,-   35.662345,     0.516477,-  0.0024527
8. QUENCH LIMITS(LOW,HIGH):   52,  83
```

```
1. STANDARDS ID: WACKER/45CA/UEBERST.
2. UNK ID: 3H / 45CA
   UNKNOWN NORMALIZATION FACTOR:
    CHANNEL #1:        1.00000000
    CHANNEL #2:        1.00000000
3. BKGRD CONSTANT QUENCH? Y
4. HALF LIFE(DAYS):
    ISOTOPE #1:       4492.0000
    ISOTOPE #2:        153.0000
5. CALCULATE COEFF.? N
6. AVERAGE BKGRD:
    CHANNEL #1:       0.000000
    CHANNEL #2:       0.000000
7. QUENCH COEFFS(A,B,C,D):
    ISOTOPE #1:
     CHANNEL #1:     341.696985,-   13.030916,     0.195000,-  0.0009845
     CHANNEL #2:     152.861402,-    6.548266,     0.101037,-  0.0005142
    ISOTOPE #2:
     CHANNEL #1: -   705.895051,    35.047884,-    0.567730,   0.0030358
     CHANNEL #2:    1191.571632,-   52.783211,     0.819114,-  0.0041830
8. QUENCH LIMITS(LOW,HIGH):   52,  72
```

## L. Ausdruckbeispiel ($Ca^{++}$-Austausch)

```
UNKNOWN ID: 3H/45CA
STANDARDS ID: WALKER/45CA/SEDIMENT

SAMP POS CH      CPM      2SX    TIME  ELTIME  HH

  1    6  1   50820.00  1.98     .20    3.85  78
          2   51380.00  1.97

ISOTOPE #1  DPM(NORM.):   99143.97 EFF(1):  47.54 EFF(2):  12.12
ISOTOPE #2  DPM(NORM.):   52787.20 EFF(1):   6.98 EFF(2):  74.47

  2    7  1   49742.85  1.95     .21    5.56  81
          2   51552.38  1.92

ISOTOPE #1  DPM(NORM.):   97572.97 EFF(1):  47.16 EFF(2):  12.32
ISOTOPE #2  DPM(NORM.):   53207.22 EFF(1):   7.00 EFF(2):  74.30

  3    8  1   51125.00  1.97     .20    7.26  81
          2   53620.00  1.93

ISOTOPE #1  DPM(NORM.):  100153.98 EFF(1):  47.16 EFF(2):  12.32
ISOTOPE #2  DPM(NORM.):   55562.47 EFF(1):   7.00 EFF(2):  74.30

  4    9  1   51415.00  1.97     .20    8.87  77
          2   53050.00  1.94
```

**Literaturverzeichnis**

1. BERRY, FRIEND, SCHEUER:
Morphology and Metabolism of Intact Muscle Cells Isolated from Adult Rat Heart.
Circulation Research. Vol. XXVI, 679 - 687 (June 197o)

2. BLOOM, S., BRADY, A.J., LANGER, G.A.:
Calcium Metabolism and Active Tension in Mechanically Disaggregated Heart Muscle.
Journ. of Molec. and Cel. Cardiol. 6, 137 - 147 (1974)

3. CLARK, M.G. et al.:
An Improved Procedure for the High-yield Preparation of Intact Beating Heart Cells from the Adult Rat.
Biochemical and Morphologic Study.
Journ. of Molec. and Cell. Cardiol. 1o, 11o1 - 1121 (1978)

4. DANI, A.M. et al. :
Preparation and Some Properties of Isolated Beating Myocytes from Adult Rabbit Heart.
Journ. of Molec. and Cell. Cardiol. 9, 777 - 784 (1977)

5. DOW, J.W., HARDING, N.G.L., Powell, T.:
Isolated Cardiac Myocytes.
Preparation of Adult Myocytes and their Homology with the Intact Tissue.
Cardiovascular Research, 15, 483 - 514 (1981)

6. DOWN, J.W., HARDING, N.G.L., Powell, T.:
Isolated Cardiac Myocytes.
Functional Aspects of Mature Cells.
Cardiovascular Research, 15, 549 - 579 (1981)

7. FARMER, B.B. et al. :
Isolation and Characterisation of Adult Rat Heart Cells.
Archives of Biochemistry and Biophysics 179, 545 - 558 (1977)

8. FEUVRAY, D., de LEIRIS, J. :
Effect of Short Dimethylsulfoxid Perfusions on Ultrastructur of the Isolated Rat Heart.
Journ. of Molec. and Cell. Cardiol. 5, 63 - 69 (1973)

9. FRY, D.M., SCALES, D., INESI, G.:
The Ultrastructure of Membrane Alterations of Enzymatically Dissociated Cardiac Myocytes.
Journ. of Mol. and Cell. Cardiol. 11, 1151 - 1163 (1979)

1o. GOULD, R.P., POWELL, T.:
Intact Isolated Muscle Cells from the Adult Rat Heart.
Physiological Society, 16 P - 19 P (June 1972)

11. HAK, OFFERIJNS, VERHEUL:
Toxic Effects of DMSO on Cultured Beating Heart Cells at Temperatures Abore Zero.
Cryobiology 1o, 244 - 25o (1973)

12. HARARY, I., SLATER, E.C. :
Studies in Vitro on Single Beating Heart Cells.
The Effect of Oligomycin, Dinitrophenol and Ouabain on the Beating Rate.
Biochim. Biophys. Acta 99, 227 - 233 (1965)

13. ISBENBERG, G., KLÖCKNER, U.:
Glycocalix is not Required for Slow Inward Calcium Current in Isolated Rat Heart Myocytes.
Nature, Vol. 284, Nr. 5754, pp. 358 - 36o (March, 27, 198o)

14. KATZ, REPKE, UPSHAW, POLASCIK:
Characterisation of Doy Cardiac Microsomes.
Use of zonal centrifugation to fractionated fragmentes screoplasmatic reticulum ($Na^+ + K^+$) - activated ATP use and Mitochondrial Fragments.
Biochim. Biophys. Acta, 2o5, 473 - 49o (197o)

15. LOCHNER, A. et al:
Substrat Effects on Mitochondrial Function and Tissue Lipids in Low-Flow Hypoxia of Isolated Perfused Rat Hearts.
Basic. Res. Cardiologie 74, 3o3 - 312 (1979)

16. LOVELOCK, J.E., BISHOP, M.W.H.:
Prevention of Freezing Damage to Living Cells by Dimethylsulphoxide.
Nature Vol. 183, 1394 - 1395 (1959)

17. MOUSTAFA, E., SKOMEDAL, T., OSNES, J.B., ØYE, I.:
Cyclic AMP Formation and Morphology of Myocardial Cells isolated from Adult Heart : Effect of $Ca^{2+}$ and $Mg^{2+}$.
Biochim. Biophys. Acta, 421, 411 - 415 (1976)

18. PENPARGKUL, S., SCHEUER, J. :
Metabolic Comparisons between Hearts Arrested by Calcium Depriration or Potassium Excess.
Americ. Journ. of Physiology, Vol. 217, Nr. 5, 14o5 - 14o9 (1969)

19. SHLAFER, M., KAROW, A.M.:
Ultrastructure- Function Correlative Studies for Cardiac Cryopreserration.
I Hearts perfused with various concentrations of Dimethylsulfoxide (DMSO).
Cryobiology 8, 28o - 289

2o. TSOKOS, J., BLOOM, Sh.:
Effects of Calcium on Respiration and ATP Content of Isolated, Leaky, Heart Muscle Cells.
Journ. of Molec. and Cell. Cardiol. 9, 823 - 836 (1977)

21. TSOKOS, J., BLOOM, Sh.:
Respiratory Control in Hyperpermeable Adult Heart Muscle Cells. Effects of Calcium.
Biochim. Biophys. Acta 423, 42 - 51 (1976)

22. VAHOUNY, G.V., WEI, R., STARKWEATHER, R., DAVIS, O.:
Preparation of Beating Cells from Adult Rats.
Science Vol. 167, 1616 - 1618 (197o)

23. YOUNG, D.A.B.:
Preparation of Isolated Cells from Rat Heart.
Experientia, 32, 1389 - 139o (1976)

24. ZIMMERMANN, A.N.E. et al.:
Morphological Changes of Heart Muscle Caused by Successive Perfusion with Calcium-free and Calcium-containing Solutions (Calcium Paradox).
Cardiovascular Research 1, 2o1 - 2o9 (1967)

**Danksagungen**

Herrn Professor Dr. med. E. Noack danke ich für die freundliche Überlassung dieser Arbeit, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die zur Durchführung der Arbeit erforderlichen Mittel, besonders aber für seine über 2 Jahre währende Betreuung und seine zahlreichen wertvollen Hinweise bei der Ausführung und Auswertung der Versuche.

Herrn G. Steinbach gilt der besondere Dank für die freundliche und tatkräftige Unterstützung beim Aufbau der Versuchsanordnungen.

Herrn Professor Dr. Borchard und seiner Mitarbeiterin Frau Ernser, Pathologisches Institut der Universität Düsseldorf, danke ich für die Erstellung und Beurteilung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

**Lebenslauf**

| | |
|---|---|
| Name: | Wacker, Peter |
| geboren: | 31.1o.1949 |
| Geburtsort: | Bochum |
| 1956 - 196o | Volksschule in Bochum |
| 196o - 1966 | Adalbert-Stifter-Gymnasium in Castrop-Rauxel |
| 1966 - 197o | Helmholtz-Gymnasium in Dortmund |
| 197o | Reifeprüfung |
| 197o - 1972 | Ausbildung zum Apotheker-assistenten |
| 1973 - 1976 | Studium der Lebensmittel-chemie an der Universität Karlsruhe |
| 1976 - 198o | Studium der Medizin an der Universität Düsseldorf |
| 198o - 1982 | Studium der Medizin an der Universität Münster |
| 1982 | Staatsexamen und Approbation als Arzt |
| Seit 1982 | Assistenzarzt in der Abteilung Innere Medizin der Krankenhaus GmbH Burgsteinfurt |

verheiratet seit 1978 mit Frau Mechthild geb. Kahrmann